



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Scienze Cardiovascolari

Ciclo XXVII

TITOLO TESI

La Metabolomica: una nuova era in Cardiologia.

**Le nostre esperienze originali nei campi dell' insufficienza cardiaca, della
cardiopatía ischemica e dell' ipertensione polmonare**

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza

MED/11

Presentata da:

Dr. Martino Deidda

Coordinatore Dottorato

Prof. Francesco Marrosu

Tutor

Prof. Giuseppe Mercurò

Relatore

Prof. Giuseppe Mercurò

Esame finale anno accademico 2013 – 2014

Indice

Introduzione

<i>La metabolomica</i>	4
------------------------	---

La metabolomica: un approccio traslazionale agli adattamenti metabolici e funzionali del miocardio in corso di scompenso cardiaco

<i>Introduzione</i>	11
<i>Materiali e metodo</i>	22
<i>Risultati</i>	31
<i>Discussione</i>	39

Studio del profilo metabolico su sangue coronarico di pazienti sottoposti a PCI elettiva

<i>Introduzione</i>	46
<i>Materiali e metodo</i>	56
<i>Risultati</i>	60
<i>Discussione</i>	67

Relazione tra resistenze vascolari polmonari e profilo metabolomico da prelievo in situ In pazienti affetti da sclerosi sistemica

<i>Introduzione</i>	73
<i>Materiali e metodo</i>	77
<i>Risultati</i>	80
<i>Discussione</i>	86

Conclusioni	95
Bibliografia	96

Introduzione

La Metabolomica

La ricerca traslazionale è comunemente intesa come ricerca di base con possibilità di trasferimento pressoché diretto alla clinica (“from bench to bedside”). In maniera più completa può essere definita come la sinergia tra ricerca di base e ricerca clinica, con reciproco trasferimento di informazioni e metodiche di analisi, volta a identificare nuovi approcci diagnostico-terapeutici.

Le scienze “omiche”, per le loro caratteristiche intrinseche e per il loro rapido progresso, si stanno imponendo come le basi su cui fondare questo nuovo approccio alla ricerca in campo biomedico.

Esse sono un gruppo di metodologie analitiche applicate allo studio di geni, trascritti, proteine e metaboliti che nell’insieme costituiscono una cellula, un tessuto o un organismo.

La genomica può essere descritta come l'analisi completa della struttura e della funzione del DNA; capire le biodiversità a livello dell'intero genoma consentirà una migliore comprensione dell'origine dei tratti individuali e della suscettibilità alle malattie. Essa non include solo lo studio dei polimorfismi e delle mutazioni nel DNA ma comprende anche, attraverso la sub-disciplina della trascrittomica, l'analisi globale dell'espressione genica di una cellula.

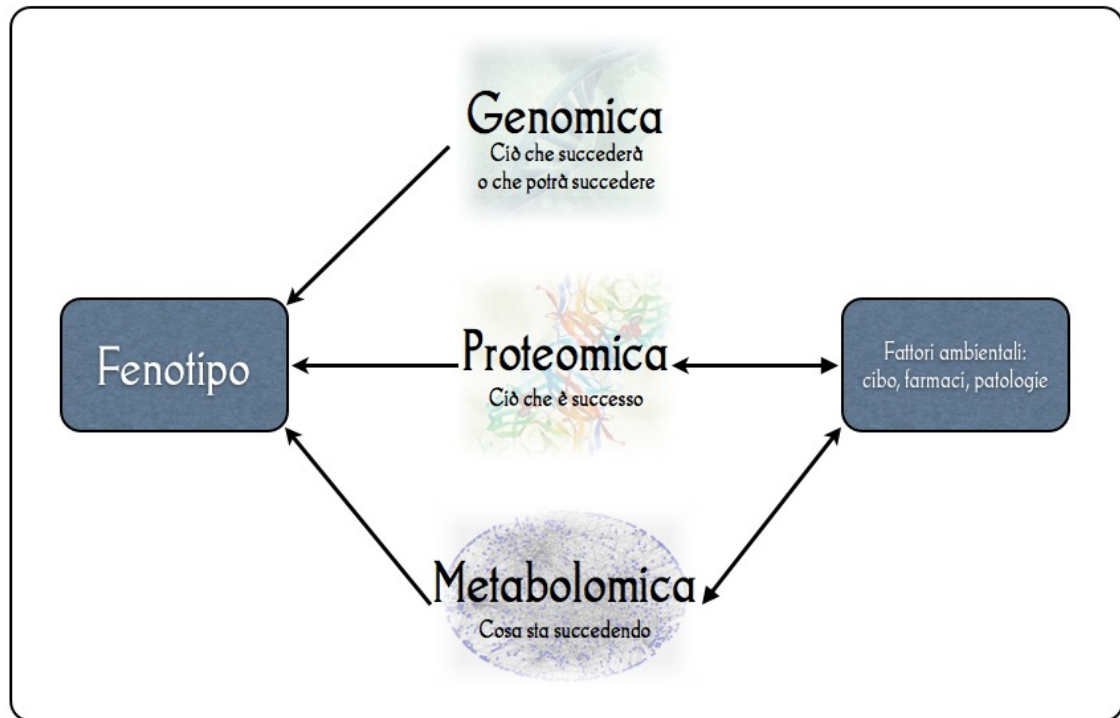
La proteomica comporta lo studio sistematico delle proteine, al fine di fornire una visione completa della struttura, della funzione e della regolazione dei sistemi biologici. La Metabolomica è lo studio sistematico del metaboloma, che rappresenta l'insieme di tutti i metaboliti coinvolti come intermedi e/o prodotti finali dei processi biochimici di una cellula, tessuto, organo o organismo.

I dati sull'espressione genica e l'analisi proteomica non sono in grado, da soli, di fornire una esauriente descrizione dei processi in atto, siano essi di origine endogena o indotti da uno stimolo esogeno.

Il profilo metabolico, al contrario, può essere visto come il prodotto finale dell'espressione genica e dell'attività proteica (enzimi), definendo così il fenotipo biochimico di un sistema biologico nel suo insieme.

Mentre la genomica e la proteomica suggeriscono un possibile modo di funzionamento di un sistema biologico, la metabolomica ne dà una rappresentazione attuale e più prossima al reale (Figura 1).

Figura 1. Interrelazioni tra le principali scienze “omiche”



Infatti, i geni *per se* non predicono il fenotipo, che è il risultato della costituzione genica, delle influenze ambientali e delle condizioni fisiopatologiche che possono sovrapporsi nel corso del ciclo vitale di un organismo; pertanto, la genomica, la trascrittomica e la proteomica si limitano ad indicare le cause potenziali di una risposta fenotipica, ma non sono in grado di prevedere cosa accadrà al livello successivo.

La Metabolomica che, come già detto, è lo studio del profilo dei metaboliti di un sistema biologico, fornisce al contrario una visione funzionale di un organismo *in toto*, come risultato di:

- ✓ assetto genico
- ✓ espressione genica tramite produzione di RNA;
- ✓ attività delle proteine;
- ✓ interazione con fattori ambientali (es. alimentazione, farmaci, trattamenti etc).

Essa può quindi essere considerata come una sorta di genomica funzionale, nell'ambito della quale i metaboliti costituiscono le basi su cui sono costruiti tutti i processi cellulari; essa riflette lo stato di equilibrio funzionale degli eventi biologici in un determinato sistema.

In particolare, la metabonomica è stata definita come la "misurazione quantitativa della risposta multiparametrica metabolico-dinamica dei sistemi viventi a stimoli fisiopatologici o alla modificazione genetica", mentre la metabolomica è lo studio della "serie completa di metaboliti / intermedi a basso peso molecolare, in quanto fattori dipendenti da fisiologia, sviluppo e stati patologici della cellula, tessuto, organo o organismo..."[1-3]; questi due termini sono attualmente utilizzati in modo intercambiabile e sono divenuti sinonimi.

Come precisato sopra, la metabolomica è in grado di fornire un profilo dello stato metabolico globale delle cellule, dei tessuti e degli organismi nell'ambito sia delle condizioni fisiologiche che di quelle patologiche. Tutti i processi biologici (sia "naturali" che indotti da ischemia, farmaci, ormoni) avvengono attraverso una sequenza di reazioni/interazioni biochimiche che generano un

vasto e complesso insieme di metaboliti, molti dei quali verranno rilasciati nel sangue e nell'urina, dove saranno rilevabili con metodiche specifiche. Le tecniche utilizzate in metabolomica sono in grado di rilevare molecole di peso molecolare relativamente basso (<1000 Da), tra cui nucleotidi, oligopeptidi, aminoacidi, acidi grassi, lipidi, carboidrati, vitamine, acidi organici; tali analisi si effettuano sia su biofluidi (plasma, urine, liquido cerebrospinale, saliva, etc) che su tessuti intatti (cuore, fegato, rene, cervello, etc)[4].

L'approccio metabolomico consiste in due fasi sequenziali:

I. Metodiche di analisi. Forniscono un profilo completo dei metaboliti a basso peso molecolare presenti in un campione, generando uno spettro che è caratteristico di ciascuna metodica impiegata (Figura 4). Non esiste un'unica tecnica in grado di fornire tutte le informazioni sul metabolismo, in quanto i metaboliti possono essere misurati con diversi metodi analitici. Le principali tecniche sperimentali applicate dalla metabolomica sono la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) e la spettrometria di massa (MS)[5-7]. La spettrometria di massa, generalmente combinata con la separazione cromatografica, permette l'individuazione delle molecole di un campione biologico in base al rapporto massa / carica, e la loro rappresentazione in uno spettro. La NMR protonica (^1H -NMR) permette la caratterizzazione, all'interno di un campione biologico, dei protoni contenuti nei vari metaboliti e la loro rappresentazione in uno spettro. Uno dei principali vantaggi della tecnica di spettroscopia ^1H -NMR è l'essere un metodo altamente riproducibile, non selettivo, rapido e non distruttivo. Inoltre, generalmente non richiede alcuna preparazione del campione e può essere applicato all'analisi di campioni di tessuto. D'altro canto, questa tecnica è però caratterizzata da una sensibilità piuttosto bassa, dalle potenziali difficoltà nel quantificare i metaboliti co-risonanti e dagli alti costi delle apparecchiature necessarie. Al contrario, la tecnica di MS-GC è altamente specifica e sensibile; essa è generalmente combinata con tecniche di separazione come la gas-cromatografia (GC) o la cromatografia liquida (LC).

2. Processazione ed interpretazione dei dati. L'analisi dei campioni biologici con tecnologie "omiche" produce generalmente una serie di dati estremamente complessa, in base ad un procedimento basato su:

- ✓ acquisizione e analisi del segnale;
- ✓ normalizzazione dei dati;
- ✓ analisi statistiche;
- ✓ costruzione di un modello predittivo.

Per quanto riguarda la metabolomica, i dati provengono dalla misurazione di una serie di metaboliti (variabili) per un certo numero di individui (osservazioni). Per la raccolta, l'elaborazione e interpretazione dei dati sono stati sviluppati due diversi approcci:

- ✓ metodi chemiometrici;
- ✓ metodi quantitativi (profilazione mirata).

Con il primo approccio, i dati spettroscopici sono solitamente analizzati con l'utilizzo di tecniche chemiometriche e di metodiche di pattern-recognition, al fine di estrarre informazioni metaboliche latenti e consentire una classificazione ed identificazione del campione biologico; una caratteristica di tali tecniche è quella di utilizzare ai fini dell'analisi un numero ridotto di fattori rispetto all'intero spettro di dati, evidenziando la tendenza di gruppi di metaboliti a variare nello stesso modo piuttosto che le singole variazioni. Nell'analisi dei dati multivariabili, invece, possono esserci due approcci principali: quello senza supervisione e quello controllato; il primo riduce la complessità dei dati spettrali e li rappresenta per mezzo di trame: si tratta di un approccio che consente di scandagliare un qualsiasi gruppo di campioni per vedere se al suo interno i diversi gruppi di individui presentano delle differenze a seconda delle loro variabili. L'approccio controllato utilizza una serie di campioni di prova per creare dei modelli matematici da utilizzare poi per classificare un

set di dati indipendente; a differenza di quello senza sorveglianza, questo metodo permette di prevedere a quale gruppo apparterrà un nuovo campione, sulla base delle caratteristiche spettrali che presenta.

Nell'ultimo decennio si è assistito ad un progressivo incremento del numero di pubblicazioni di lavori scientifici condotti in campo cardiovascolare (CV) utilizzando la metabolomica, confermando un trend comune ad altre specializzazioni mediche.

Su queste basi è nato il presente lavoro di dottorato, che ha avuto come obiettivo quello di valutare l'applicazione della metabolomica allo studio di alcuni dei più importanti topics della cardiologia con un approccio originale, consistito nella partecipazione diretta del cardiologo clinico all'analisi e all'interpretazione dei dati nell'ambito di un team multidisciplinare in cui medici, chimici, biologi e fisici contribuissero, ognuno con le proprie competenze, a cercare di chiarire i meccanismi biologici alla base di determinate patologie CV, con l'intento non solo di aumentare la conoscenza sulla loro eziopatogenesi ma anche di individuare potenziali nuovi target diagnostici e terapeutici.

Verranno pertanto presentati i dati disponibili allo stato attuale su tre protocolli in essere presso il nostro Dipartimento, relativi allo Scompenso cardiaco, alla cardiopatia ischemica stabile e all'ipertensione polmonare secondaria a connettivite.

LA METABOLOMICA: UN APPROCCIO TRASLAZIONALE
AGLI ADATTAMENTI METABOLICI E FUNZIONALI DEL MIOCARDIO
IN CORSO DI SCOMPENSO CARDIACO

Introduzione

Lo scompenso cardiaco (SC) costituisce una delle principali patologie croniche nei paesi occidentali [8,9]: i 51 stati membri dell'ESC costituiscono una popolazione di oltre 900 milioni di abitanti con almeno 15 milioni di pazienti affetti da SC, a cui si aggiunge una simile prevalenza di pazienti asintomatici con disfunzione ventricolare. Lo SC e la disfunzione ventricolare asintomatica sono, quindi, riscontrabili nel 4% circa di questa popolazione. La prevalenza dello SC è del 2-3% ed aumenta drammaticamente nella fascia di età intorno ai 75 anni, raggiungendo il 10-20% nei pazienti di 70-80 anni. Nei soggetti più giovani, lo SC è più frequente fra quelli di sesso maschile in quanto la cardiopatia ischemica, la causa scatenante più diffusa, si sviluppa nelle decadi di età meno avanzate. Fra gli anziani, invece, la prevalenza è simile in entrambi i sessi [10,11]. Lo SC costituisce il 5% di tutte le cause di ospedalizzazione per un episodio acuto, è riscontrabile nel 10% dei pazienti ospedalizzati e rappresenta circa il 2% della spesa sanitaria[12].

Tuttavia, l'ammontare di tali spese è destinato ad aumentare ulteriormente a causa del miglioramento delle terapie volte al trattamento delle patologie causa dello SC stesso e del progressivo allungamento dell'aspettativa di vita nei paesi occidentali.

Le linee guida 2012 dell'European Society of Cardiology sullo SC definiscono tale patologia come “una sindrome clinica” nell'ambito della quale “i pazienti che ne sono affetti presentano le seguenti caratteristiche: sintomi di SC, e cioè dispnea sia a riposo che sotto sforzo, e affaticabilità; segni di

ritenzione idrica come congestione polmonare ed edemi declivi; ed evidenza oggettiva di anomalia cardiaca, funzionale o strutturale, a riposo”[10] (Tabella 1); questa definizione sottolinea come lo SC sia un’entità multiforme (Tabella 2) e multifattoriale, molti aspetti della cui fisiopatologia sono tuttora lontani dall’essere completamente compresi.

Tabella 1. Definizione di SC

Lo scompenso cardiaco è una sindrome clinica ed i pazienti che ne sono affetti hanno le seguenti caratteristiche:	
<i>sintomi tipici di scompenso cardiaco</i>	dispnea a riposo e sotto sforzo, affaticabilità, astenia, edemi declivi
<i>segni tipici di scompenso cardiaco</i>	tachicardia, tachipnea, rantoli polmonari, versamento pleurico, elevata pressione giugulare, edema periferico, epatomegalia
<i>evidenza oggettiva di anomalia cardiaca, strutturale o funzionale, a riposo</i>	cardiomegalia, terzo tono cardiaco, soffi cardiaci, alterazioni all'ecocardiogramma, elevati livelli di peptidi natriuretici

Task Force for Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure of European Society of Cardiology 2008

Lo SC è la via comune finale di gran parte delle patologie cardiovascolari (Tabella 3) e, quando cronicizzato, ha una storia naturale simile a prescindere da quale ne sia stata la causa eziologica.

Tabella 2. Cause più frequenti di scompenso cardiaco dovuto a disordini del muscolo cardiaco (malattia miocardica)

<i>Malattia coronarica</i>	Molteplici manifestazioni
<i>Ipertensione</i>	Spesso associata ad ipertrofia ventricolare sinistra e frazione di eiezione conservata
<i>Cardiomiopatie</i>	Forme familiari/genetiche o non familiari/non genetiche (incluse quelle acquisite come la miocardite) Ipertrofica, dilatativa, restrittiva, aritmogena del ventricolo destro, non classificata
<i>Farmaci</i>	Betabloccanti, calcioantagonisti, antiaritmici, agenti citotossici
<i>Tossine</i>	Alcool, medicinali, cocaina, minerali tossici (mercurio, cobalto, arsenico)
<i>Endocrina</i>	Diabete mellito, ipo/ipertiroidismo, sindrome di Cushing, insufficienza surrenalica, ipersecrezione dell'ormone della crescita, feocromocitoma
<i>Nutrizionale</i>	Carenza di tiamina, selenio, carnitina Obesità, cachessia
<i>Infiltrativa</i>	Sarcoidosi, amiloidosi, emocromatosi, malattia del tessuto connettivo
<i>Altro</i>	Malattia di Chagas, infezione da HIV, cardiomiopatia peripartum, insufficienza renale terminale

Task Force for Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure of European Society of Cardiology 2008

Negli ultimi 20 anni, si è assistito ad un sostanziale miglioramento nelle possibilità terapeutiche di tale patologia con l'utilizzo degli inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE)[13,14], degli antagonisti dell'aldosterone[15], dei β -bloccanti[16,17] e della terapia di resincronizzazione[18,19]. Nonostante tali trattamenti, tuttavia, il tasso di mortalità annua per questi pazienti si aggira ancora intorno al 10%. Per tali ragioni, la ricerca volta ad identificare nuove possibilità terapeutiche costituisce uno dei maggiori capitoli della cardiologia moderna.

Lo SC cronico è una patologia multifattoriale; vi sono molte ragioni per le quali un cuore può andare incontro a scompenso, ma recentemente sta ricevendo crescente attenzione lo studio delle alterazioni del metabolismo energetico che si manifestano nel corso della storia naturale della malattia[20].

Il concetto che il cuore in corso di scompenso vada incontro ad un progressivo impoverimento delle riserve energetiche e della capacità di rinnovarle è stato proposto per la prima volta nel 1939 da Herrmann e Decherd[21], che nel loro pionieristico studio hanno descritto una grave riduzione del contenuto di creatina nel miocardio “insufficiente”. Tale concetto è stato, da allora, più volte ripreso da vari gruppi[22-24], fino al rinnovato interesse manifestatosi negli ultimi anni[25-36].

Effettivamente, il depauperamento delle riserve energetiche a livello miocardico riveste un ruolo di primaria importanza nello sviluppo e mantenimento della disfunzione cardiaca; il cuore utilizza circa 6 Kg di ATP ogni giorno, pari a circa 20-30 volte il suo peso. Nell'arco delle 24 ore, esso si contrae circa 100.000 volte e immette in circolo approssimativamente 10 tonnellate di sangue[22]; per portare a termine un tale carico di lavoro, il cuore utilizza l'energia chimica contenuta negli acidi grassi e nel glucosio trasformandola in energia meccanica. L'incapacità del miocardio di produrre quantità adeguate di energia può quindi portare ad una disfunzione meccanica.

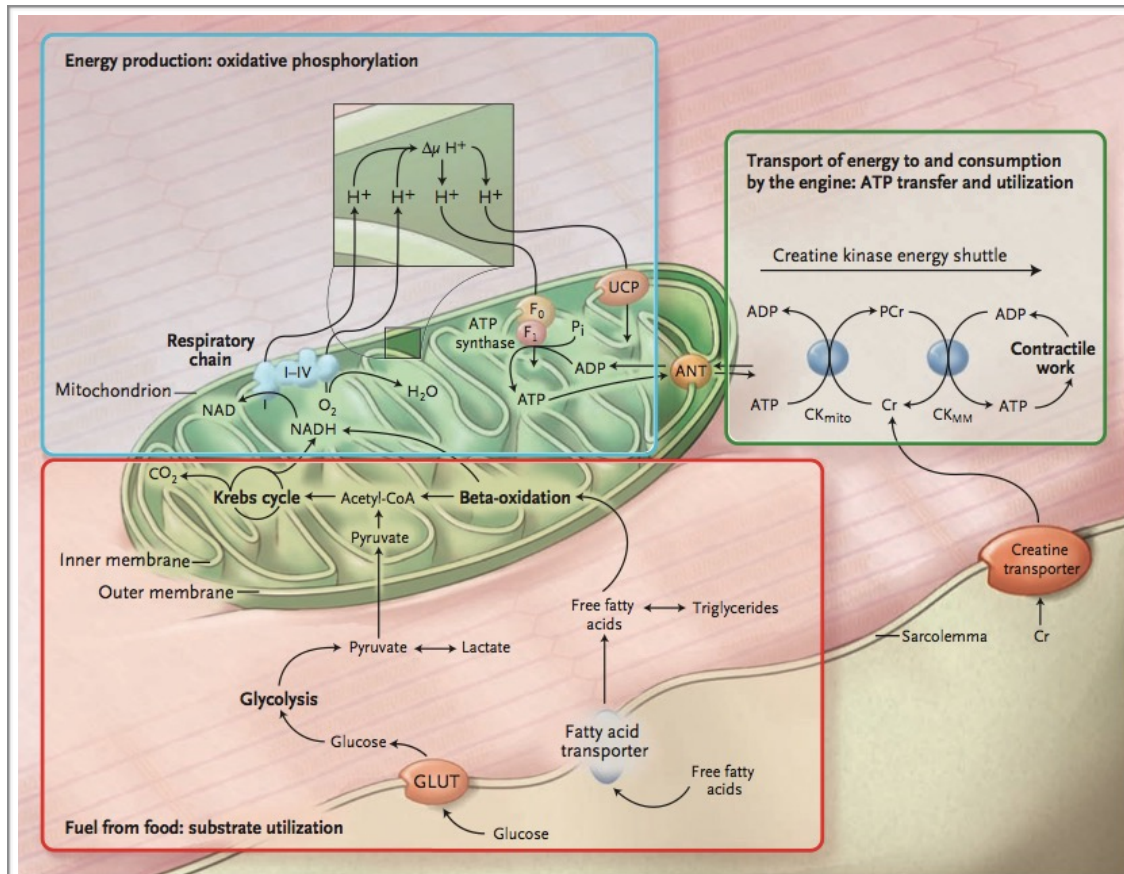
Il metabolismo cardiaco è estremamente complesso (Figura 2); esso è costituito da 3 componenti principali:

3. Utilizzo dei substrati, principalmente acidi grassi e glucosio, attraverso glicolisi, β -ossidazione e ciclo di Krebs;
4. Fosforilazione ossidativa, che, mediante la catena respiratoria mitocondriale, produce energia sotto forma di ATP
5. Trasferimento ed utilizzo dell'energia accumulata sotto forma di ATP per la contrazione[37-39].

Nella terza fase del metabolismo energetico miocardico (trasferimento ed utilizzo dell'ATP), la creatin-chinasi mitocondriale catalizza il trasferimento di un gruppo fosfato ad alta energia dall'ATP alla creatina, determinando così la formazione di creatin-fosfato e ADP. Il creatin-fosfato è una molecola più piccola rispetto all'ATP, che può diffondere rapidamente dai mitocondri alle miofibrille, dove la creatin-chinasi citoplasmatica catalizza la reazione inversa, con rigenerazione di ATP e di creatina, che diffonde di nuovo verso i mitocondri.

La creatina è prodotta dal fegato e dai reni e giunge al cuore mediante il torrente circolatorio, dal quale è estratta mediante uno specifico trasportatore di membrana[40] in grado di determinare una differenza di concentrazione maggiore di circa 50 volte tra il versante citoplasmatico e quello extracellulare. La creatin-chinasi catalizza la fosforilazione di circa $\frac{2}{3}$ del pool miocardico di creatina, mentre il restante terzo rimane non fosforilato; una piccola quantità di creatina è costantemente persa per diffusione passiva attraverso il sarcolemma[41].

Figura 2. Metabolismo energetico miocardico (Da Neubauer S)[20]



Una funzione fondamentale del sistema della creatin-chinasi è di agire come buffer energetico, in grado di regolare l'equilibrio dinamico tra richieste e produzione di energia; quando tale equilibrio si sposta nel senso di una maggiore richiesta, i livelli di fosfocreatina diminuiscono, al fine di mantenere l'ATP nell'ambito di range ottimale, ma nel lungo termine si ha comunque un incremento delle concentrazioni di ADP[38]. L'ADP libero è in grado di inibire la funzione di numerosi enzimi, determinando così una riduzione dell'efficacia contrattile del muscolo cardiaco. In tal modo si può instaurare un rimodellamento metabolico del miocita dovuto alla riduzione delle concentrazioni di fosfocreatina con contestuale aumento di quelle di ADP, sebbene i livelli di ATP rimangano nella norma.

Una valutazione dello stato metabolico del muscolo cardiaco può essere effettuata utilizzando metodiche applicate a prelievi biotipici ottenuti da animali o da tessuti umani in corso di trapianto. Tuttavia il dosaggio dei livelli di ATP e fosfocreatina tissutali è difficoltoso a causa dell'instabilità di tali composti; per tale ragione, la principale metodica impiegata a tale scopo è la spettroscopia di Risonanza magnetica degli atomi di fosforo (^3P -NMR)[42-45], eseguibile anche con le apparecchiature comunemente utilizzate nella diagnostica per immagini (Magnetic Resonance Imaging, MRI).

D'altra parte una più esaustiva valutazione del metabolismo energetico del cuore scompensato richiederebbe, oltre alla misurazione del turnover dell'ATP[44,45], anche l'analisi del turnover del glucosio e degli acidi grassi[46-49] e dell'attività della catena enzimatica deputata alla fosforilazione ossidativa[50]. Attualmente non esistono metodiche in grado di effettuare tali valutazioni *in vivo*, ma è necessario derivarle da altre misurazioni più generali[20].

Nello SC intervengono una serie di alterazioni nel metabolismo energetico che coinvolgono tutte le fasi dei processi metabolici volti alla produzione di ATP, a partire dall'utilizzazione dei substrati;

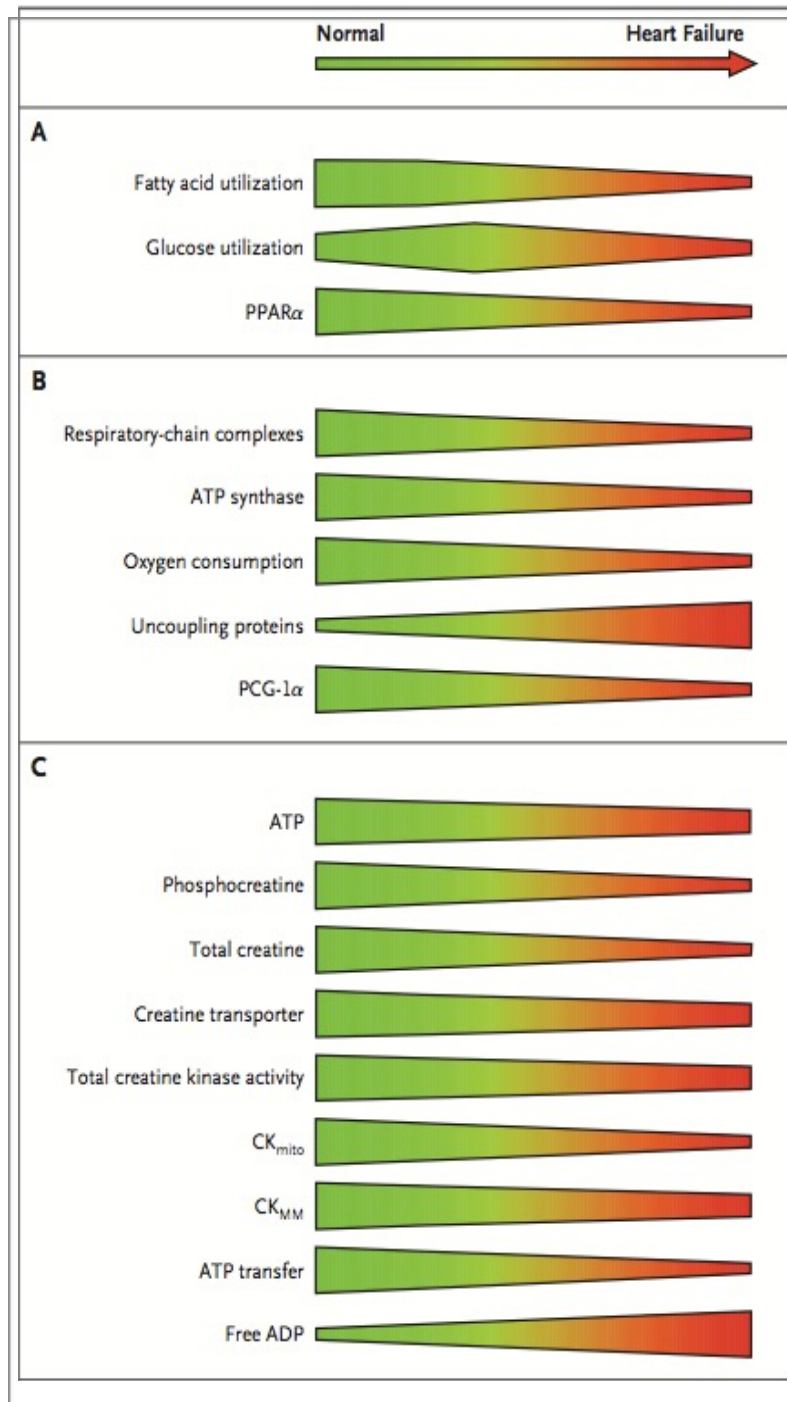
questo può avvenire come risultato di una ridotta disponibilità dei substrati stessi, di una loro ridotta ossidazione o di entrambi questi meccanismi.

Vari studi hanno mostrato come vi sia uno switch (Figura 3) da un metabolismo basato sull'utilizzo di acidi grassi verso uno più marcatamente glicidico nella progressione dagli stati precoci di SC[32,51] a quelli avanzati[52]. Tuttavia in letteratura non vi è univocità di vedute sull'interpretazione dei dati riguardanti gli studi effettuati su tale argomento[20].

Per quanto riguarda la fosforilazione ossidativa, i dati a disposizione sembrerebbero indicare un'alterazione di tutte le sue componenti: i mitocondri di cuori scompensati mostrano anomalie strutturali e probabilmente un incremento della loro numerosità [53], l'attività della catena di trasporto degli elettroni e la capacità di produrre ATP risultano ridotte[53,54], mentre alcuni lavori indicano un aumentato livello di proteine disaccoppianti[55].

Figura 3. Modificazioni nel metabolismo energetico miocardico in corso di scompenso cardiaco

(Da Neubauer S[20])



La riduzione dei livelli miocardici di ATP (approssimativamente pari a circa 10 mmol/l) può determinare una compromissione della funzione contrattile sia direttamente, per la diminuzione in termini assoluti delle molecole di ATP, sia mediante una minore efficienza nel trasporto dei fosfati ad alta energia dai mitocondri alle miofibrille (attraverso la via del creatinfosfato), sia per aumento dei livelli di ADP, che è in grado *per se* di indurre una riduzione della contrattilità.

La maggior parte delle evidenze riguardanti le alterazioni del metabolismo energetico nel cuore umano scompensato sono basati su studi effettuati mediante spettroscopia NMR degli atomi di ^{31}P ; tale metodica può essere utilizzata per valutare il rapporto Creatinfosfato/ATP, che è un forte indice dello “stato energetico” del miocardio.

Tuttavia, questo rapporto, per quanto utile, è solo l’ultima tappa di un riarrangiamento del metabolismo miocardico che, come ultima manifestazione, determina la riduzione dei livelli di fosfocreatina rispetto a quelli di ATP.

Le alterazioni metaboliche implicate in questo processo necessitano di ulteriori e più approfondite ricerche, sia per comprendere meglio la fisiopatologia dello SC, che per individuare nuove possibilità diagnostiche e nuovi target terapeutici; viste le sue peculiarità, la metabolomica potrebbe essere la metodica in grado consentire il raggiungimento di tali traguardi.

Materiali e Metodo

Popolazione studiata. Abbiamo arruolato 9 soggetti sani, che hanno costituito il gruppo di controllo (Gruppo A), 10 pazienti affetti da SC stabile con compromissione lieve-moderata della funzione sistolica (FE 35-50%; Gruppo B) e 12 con SC avanzato (FE<35%, Gruppo C).

I criteri di inclusione prevedevano: almeno un episodio di SC di qualunque eziologia, diagnosticato secondo quanto previsto dalle Linee guida ESC 2012[10] ed un'età > 18 anni; i criteri di esclusione erano costituiti da presenza di: epatopatia non congestizia, concomitanti patologie cachetizzanti, terapia aminoacidica in atto o pregressa, difetti congeniti del metabolismo e BMI >35 Kg/m².

Caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati. Nella Tabella 3 sono riassunte le caratteristiche cliniche dei 31 soggetti arruolati.

Protocollo di studio. I soggetti inclusi nei gruppi B e C sono stati arruolati tra i pazienti afferenti al Reparto ed all'Ambulatorio scompenso del nostro centro, mentre i controlli sani sono stati reclutati nell'ambito delle visite effettuate presso il nostro ambulatorio esterni tra gli utenti risultati normali o affetti la massimo da un singolo fattore di rischio cardiovascolare.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a visita cardiologica, ECG a 12 derivazioni, Ecocardiografia convenzionale ed avanzata con applicazione di metodiche Tissue Doppler (TDI) e Speckle tracking (ST), prelievi ematici per valutazione di glicemia, funzionalità epatica e renale, BNP ed un campione per l'analisi metabolomica.

Tabella 3. Caratteristiche della popolazione studiata

	Gruppo A N=9	Gruppo B N=10	Gruppo C N=12
Età (anni)	64,9 ± 8,3	66,1 ± 7,9	66,7 ± 9,9
M/F	7/2	8/2	10/2
Altezza (mt)	1,63 ± 0,06	1,67 ± 0,07	1,67 ± 0,07
Peso (Kg)	67,2 ± 12,4	74,0 ± 10,6	72,9 ± 9,6
BMI (Kg/m²)	25,2 ± 3,2	26,4 ± 3,9	26,04 ± 2,7
BSA (m²)	1,74 ± 0,17	1,77 ± 0,20	1,77 ± 0,26
Diabete	0	1	1
Classe NYHA			
I	9	8	0
II	0	2	2
III	0	0	10*
IV	0	0	0
Eziologia			
<i>Ischemica</i>	-	4	6
<i>Valvolare</i>	-	1	1
<i>CMD</i>	-	5	4
<i>Ipertensiva</i>	-	0	1
<i>Altra</i>	-	0	0
Terapie			
<i>β-bloccanti</i>	-	10	12
<i>ACE-inibitori</i>	-	9	10
<i>Sartani</i>	-	2	2
<i>Diuretici</i>	-	6	5
<i>Antialdosteronici</i>	-	3	4
<i>Ca-antagonisti</i>	-	4	3

<i>Antiaritmici</i>	-	1	3
<i>ASA</i>	-	7	8
<i>Altri antiaggreganti</i>	-	0	1
<i>Anticoagulanti</i>	-	1	2
<i>Statine</i>	-	7	9
<i>Altri ipolipemizzanti</i>	-	0	3
<i>Insulina</i>	-	1	0
<i>Ipoglicemizzanti orali</i>	-	0	1
<i>Digitale</i>	-	1	0
<i>Nitrati</i>	-	2	1
<i>Altri antipertensivi</i>	-	1	0

Ecocardiografia

Ecocardiografia standard. E' stata eseguita una valutazione ecocardiografica completa mono- e bidimensionale e color Doppler.

Sono stati misurati i volumi e gli spessori ventricolari ed è stata calcolata la FE utilizzando il metodo di Simpson biplano dalla proiezione apicale quattro camere e due camere. E' stato considerato anormale un valore $\leq 50\%$. È stata valutata la funzione diastolica registrando le velocità con il Doppler pulsato nella proiezione quattro camere apicale. Il pattern di flusso mitralico è stato misurato posizionando il volume campione tra i lembi mitralici con il PWD per misurare la velocità di picco in protodiastole (onda E) e la velocità di picco della contrazione atriale (onda A). L'esame è stato eseguito sulla scorta della traccia elettrocardiografia.

Ecocardiogramma color Doppler con metodica TDI e ST. Il TDI è una modalità ecografica che applica il principio Doppler (sia nella modalità onda pulsata che in quella codice colorato) al fine di misurare le velocità dei tessuti. Basandoci su questa tecnica, abbiamo valutato la funzione longitudinale del ventricolo sinistro misurando le velocità del movimento della valvola mitrale. Il pattern della velocità miocardica è stata misurata posizionando il volume campione nella porzione basale del setto interventricolare. Sono stati misurati il picco della velocità sistolica (onda S), il picco della velocità in protodiastole (onda E'), il picco della velocità della contrazione striale (onda A') e il tempo di rilascio isovolumetrico del ventricolo sinistro (IVRT). La LVEF è stata misurata utilizzando il metodo biplanare di Simpson.

Lo studio ST è stato condotto acquisendo dati grezzi (raw) per la valutazione di Global Longitudinal Strain (GLS) e SR longitudinale. Lo Strain è l'entità di deformazione della parete miocardica misurata tra due punti della parete stessa. È stato dimostrato che la derivata nel tempo dello Strain (SR) è un indice affidabile non invasivo della contrattilità miocardica. Il GLS è stato recentemente inserito nelle linee guida relative alla valutazione delle camere cardiache emanate

congiuntamente dalla American Society of Echocardiography e dalla European Association of Cardiovascular Imaging[56] in quanto ritenuto affidabile, riproducibile e dotato di valore predittivo incrementale rispetto alla LVEF. Inoltre, rispetto alle valutazioni basate sui flussi e sui volumi ventricolari, i parametri di deformazione miocardico non risentono delle variazioni di pre- e post-carico e della frequenza cardiaca [57], ponendosi in tal modo come indici affidabili di contrattilità. Le valutazioni ecocardiografiche sono state eseguite con un sistema commerciale fornito di TDI e ST Toshiba Artida (Toshiba Corp, Tochigi, Japan).

Analisi metabolomica

I campioni ematici sono stati ottenuti mediante puntura della vena antecubitale e raccolti in provette eparinate da 10 ml, immediatamente sottoposte a centrifugazione a 4000 rpm per 15 minuti; il surnatante è stato quindi aliquotato in cuvette da 700 µL e conservato a – 80 °C.

Estrazione FOLCH. Al momento dell'analisi $^1\text{H-NMR}$, i campioni sono stati scongelati e centrifugati a 12000 rpm per 10 minuti a 4°C; il surnatante è stata quindi processato mediante estrazione in cloroformio/metanolo: 2.4 mL di cloroformio/metanolo 1:1 in 350 µl di H_2O per 800 µl di plasma, centrifugati a 4500 rpm per 30 minuti; dopo la centrifugazione sono state separate le componenti lipofila e idrofila, 1 mL della quale è stata essiccato usando un concentratore Eppendorf (Hamburg, Germany) e quindi avviato all'analisi NMR.

Spettroscopia $^1\text{H-NMR}$. Il principio di funzionamento della spettroscopia $^1\text{H-NMR}$ è lo stesso della Risonanza per Imaging: mediante un forte campo magnetico statico e di impulsi a radiofrequenza si inducono transizioni energetiche nelle molecole che compongono le miscele in studio; per semplicità si farà riferimento da adesso in poi alle sole miscele liquide. L'eccitazione energetica si esercita sui soli nuclei capaci di interagire con il campo magnetico statico: nel nostro caso eccitiamo gli atomi di idrogeno dei vari gruppi che compongono le molecole della miscela. Dopo tale eccitazione si predispone un sistema di ricezione per “captare” il segnale del rilassamento energetico delle molecole.

Gli idrogeni di molecole differenti percepiranno i campi esterni in maniera diversa per via del diverso effetto di schermo prodotto dalle correnti elettroniche. Questo vuol dire che l'energia assorbita da idrogeni di molecole differenti è diversa e quando queste molecole rilasceranno emetteranno energia in maniera diversa, producendo segnali elettromagnetici che decadono nel tempo e che costituiscono il cosiddetto FID, Free Induction Detection. Il ricevitore dello

spettrometro, molto simile alle bobine di ricezione che si usano in Risonanza ad imaging, raccoglie i segnali di rilassamento e da questi si può risalire alla composizione della miscela.

L'analisi ^1H -NMR dei nostri campioni è stata effettuata mediante uno spettrometro NMR INOVA500 della VARIAN che opera ad una frequenza di 499.839 MHz, corrispondente ad un campo magnetico di 11 Tesla ed equipaggiato con un double resonance probe (Agilent Technologies, CA, USA); al momento dell'analisi gli estratti della frazione idrofilica del plasma sono stati ridissolti in 650 μl di D_2O (99,8%, Cambridge Isotope Laboratories Inc, Andover, USA) contenente lo standard interno sodio 3-trimetilsilil-propionato-2,2,3,3,- d_4 (TSP, 98 atom % D, Sigma-Aldrich, Milan) con una concentrazione finale 0.5 mM. Gli spetti sono stati acquisiti a 300K con ampiezza spettrale di 6000Hz, con un pulse di 90° , 2" di tempo di acquisizione, un relaxation delay di 2 secondi e 256 scans. I segnali residui dell' H_2O sono stati soppressi applicando una tecnica di presaturazione.

Preprocessazione dei dati ^1H -NMR ed analisi statistica multivariata. Gli spettri ^1H -NMR acquisiti sono stati importati nel software MestReNova (Version 7.1.2, Mestrelab Research S.L.) e pre-processati con un line broadening a 50 Hz, allineamento alla linea di base a 64K, e applicazione della trasformata di Fourier. Ogni spettro è stato quindi sottoposto a correzione di fase e della linea di base. Il riferimento per il chemical shift è stato posto a livello del picco del TSP, impostato come 0.00 ppm. Le regioni comprese tra 0.50 e 8.66 ppm sono state quindi integrate in regioni spettrali (bins) di uguale ampiezza (0.04 ppm); la regione compresa tra 4.74 e 4.94 ppm è stata esclusa per eliminare gli effetti delle variazioni nella presaturazione dovute ai segnali di risonanza dell' H_2O residua. L'area integrata di ciascun bin è stata normalizzata a 100 in modo da rendere confrontabili i vari spettri.

Il dataset finale è risultato costituito da una matrice 33x199, nella quale le righe rappresentavano i campioni e le colonne l'area normalizzata di ciascun bin (variabili). Tale matrice è stata importata nel software SIMCA-P+ (Version 13.0, Umetrics, Sweden), e sottoposta a Pareto scaling.

Le analisi multivariate applicate sono state: (i) una non supervisionata Principal Component Analysis (PCA) per una valutazione preliminare della distribuzione dei campioni; (ii) una proiezione delle strutture latenti mediante regressione Partial Least Squares (PLS); (iii) una classificazione supervisionata utilizzando l'Orthogonal Partial Least Squares - Discriminant Analysis (OPLS-DA) per l'identificazione delle variabili più importanti nella discriminazione dei gruppi.

La PCA è una tecnica che trasforma le variabili di un dataset in un numero minore di nuove variabili latenti (intrinseche ai dati) chiamate "componenti principali", che sono non correlate l'un l'altra e che rendono conto di proporzioni decrescenti della varianza totale di ciascuna variabile originaria, di cui ogni nuova componente principale è una combinazione lineare. Il modello OPLS-DA massimizza la covarianza tra i dati delle variabili X (intensità dei picchi NMR) e la corrispondente variazione della Y (assegnazione di classe) all'interno dei gruppi; da tale modello è possibile ricavare gli score ed i coefficienti relativi alle Variable Influence on Projection (VIP), parametri in grado di descrivere l'influenza dei vari metaboliti nel determinare la distribuzione e la clusterizzazione dei campioni[58].

La qualità del modello è stata valutata sulla base del corrispondente modello PLS-DA usando sia il permutation test che la cross validation; i valori di R^2 e Q^2 così generati descrivono rispettivamente la percentuale di varianza osservata tra i dati che può essere spiegata dalle varie componenti del modello e la capacità predittiva del modello stesso.

Analisi statistica univariata. I dati antropometrici, clinici ed ecocardiografici sono stati analizzati mediante Analysis Of Variance (ANOVA) ad una via e procedura LSD (Least Significance

Difference) di Fisher. Le stesse metodiche sono state applicate ai dati NMR per valutare quali fossero le regioni spettrali ed i metaboliti principalmente coinvolti nella separazione dei gruppi. E' stata considerata statisticamente significativa una p a due code < 0.05 .

Per valutare sensibilità e specificità dei metaboliti identificati sono state calcolate le curve ROC (Receiver operating-characteristic) ed è stata valutata l'AUC (Area Under Curve) utilizzando il software ROCCT: ROC Curve Explorer & Tester; un'AUC > 0.8 indica un test con una buona capacità discriminatoria tra controlli e pazienti, laddove un'AUC < 0.5 è indice di un test privo di potenza discriminatoria.

BNP

I dosaggi del BNP sono stati effettuati utilizzando il test immunofluorimetrico non competitivo ad alta specificità Kit Triage® BNP Test (Valori normali < 100 pg/ml; sensibilità: 5-5000 pg/ml).

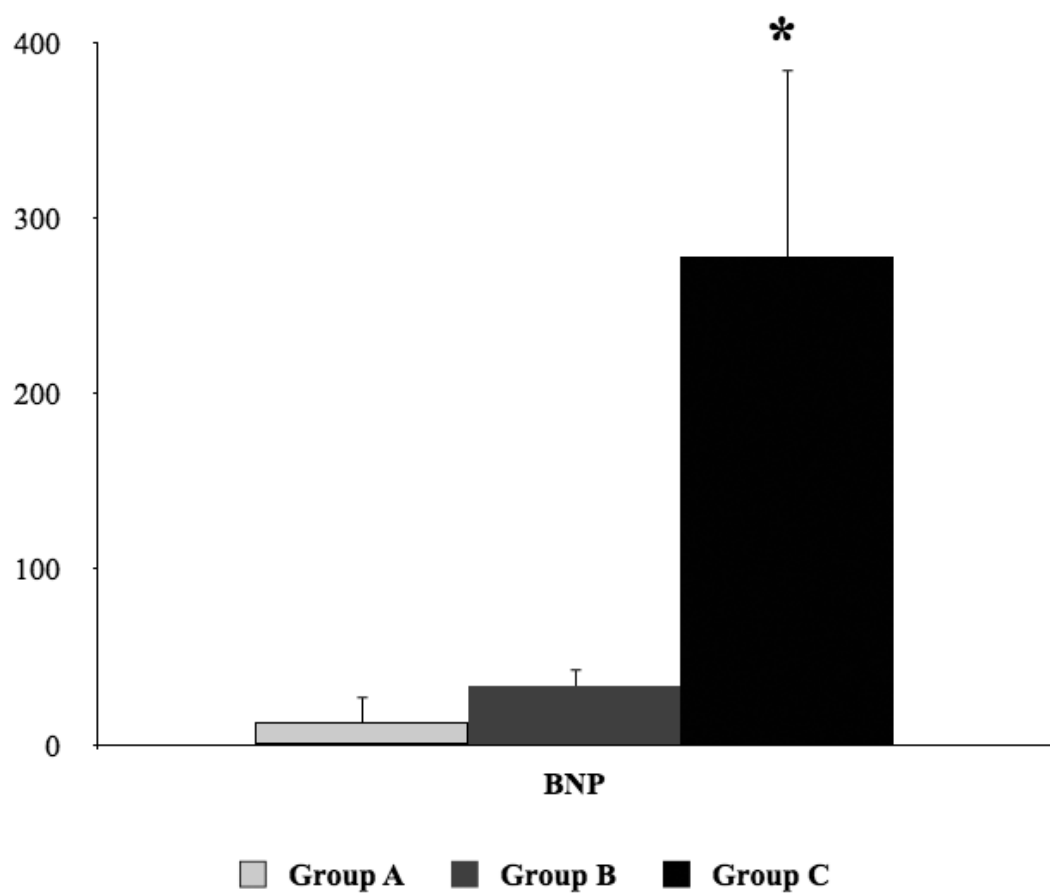
Risultati

Tutti i pazienti sono stati valutati al momento dell'arruolamento ed inseriti in un programma di Follow-up a lungo termine.

I pazienti del Gruppo B presentavano un buon compenso emodinamico, mentre quelli del Gruppo C mostravano, in accordo con i criteri di inclusione, segni e sintomi di SC; in entrambi i gruppi era presente un soggetto diabetico.

BNP

I dosaggi di BNP sono risultati nel range della norma nei gruppi A e B ($12,9 \pm 14,8$ pg/ml e $32,8 \pm 10,4$ pg/ml, rispettivamente; $p=NS$), mentre in quello C i valori ($277,4 \pm 107,2$ pg/ml) sono risultati francamente patologici ($p<0.001$ vs A e vs B; Figura 4).



* $p < 0,01$ vs Group A and Group B

Figura 4. Valori medi dei livelli di BNP nei 3 gruppi

Ecocardiografia

I dati ecocardiografici hanno evidenziato una progressiva riduzione di tutti i parametri di funzione sistolica dai controlli sani ai due gruppi di pazienti, con valori intermedi nel Gruppo B e francamente patologici in quello C.

Nel dettaglio, sono risultati progressivamente ridotti la LVEF, l'onda S al TDI e i valori di GLS (Tabella 4) e SR valutati mediante metodica ST (Figura 5).

Per quanto riguarda la funzione diastolica, è stata osservata una significativa differenza nel rapporto E/E' tra i soggetti del gruppo A ed i pazienti del Gruppo C (Tabella 5), mentre non sono risultati significativamente differenti i valori del Gruppo B in confronto a quelli del Gruppo C; tuttavia, i pazienti del Gruppo B presentavano comunque valori indicativi di una disfunzione diastolica di grado moderato.

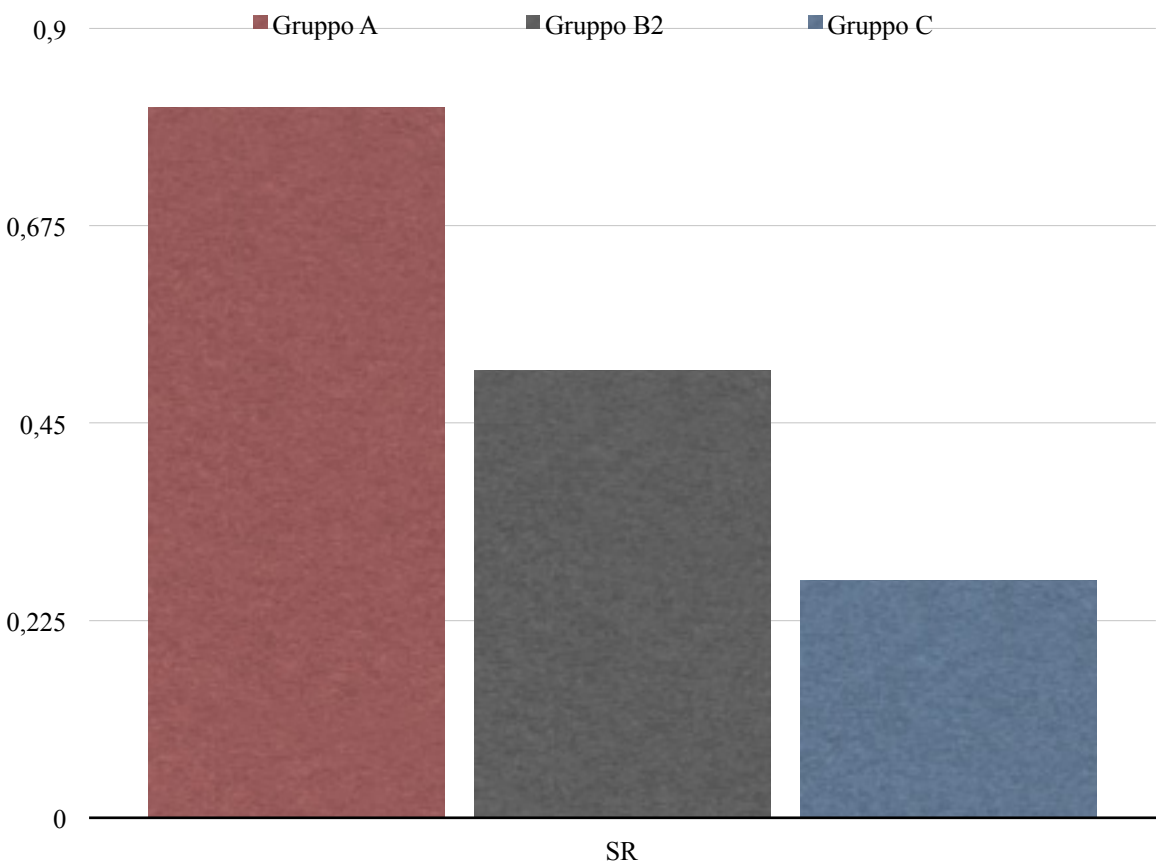
Tabella 4. Parametri ecocardiografici di funzione sistolica e diastolica nei tre gruppi

	Group A	Group B	Group C
Funzione sistolica			
LVEF (%)	61,3 ± 5,8	41,9 ± 4,0 ^{##}	25,3 ± 10,3 ^{##} ∫
S (cm/sec)	7,63 ± 3,0	5,42 ± 1,91 [#]	4,62 ± 1,84 ^{##} ∫
ε	14,2 ± 5,1	8,8 ± 3,50 ^{##}	4,7 ± 2,30 ^{##} ∫
Funzione diastolica			
E/A	0,89 ± 0,30	0,74 ± 0,30	1,79 ± 1,70
E'/A'	0,78 ± 0,30	0,78 ± 0,38	0,79 ± 0,45
E/E'	9,83 ± 3,78	12,50 ± 5,95	21,07 ± 12,21*

EDV: End-diastolic volume; **ESV:** End-systolic volume; **LVEF:** Left ventricle ejection fraction; **S:** Systolic peak velocity; **ε:** TDI-derived longitudinal strain; **E:** early ventricular filling peak velocity; **A:** Atrial (late) peak velocity; **E':** early mitral annular velocity; **A':** Late mitral annular velocity.

* p<0,05 vs Group A; ** p<0,02 vs Group A; [#] p<0,01 vs Group A; ^{##} p<0,001 vs Group A; ∫ p<0,05 vs Group B; ∫∫ p<0,001 vs Group B

Figura 5. Valori di SR nei tre gruppi



Metabolomica

Una PCA non supervisionata è stata applicata per valutare possibile differenze metaboliche tra i gruppi e, nel contempo, identificare eventuali outliers. Le prime 3 componenti hanno dato ragione del 64.8% della varianza e tutti i campioni sono risultati compresi all'interno dell'ellissi di confidenza Hotelling T2. L'analisi della scoreplot della PC1 vs la PC2 dimostra che queste due componenti sono in grado di separare i pazienti del Gruppo C da quelli dei Gruppi A e B, che appaiono piuttosto sovrapposti. La PC2 vs la PC3, invece, mostra una chiara clusterizzazione in base alla funzione sistolica; in particolare, lungo la PC2 si osserva la separazione dei pazienti del Gruppo C dagli altri due, mentre lungo la PC3 si sviluppa la separazione tra il Gruppo A e quello B. Per valutare quali fossero i metaboliti responsabili della separazione, abbiamo effettuato una OPLS-DA (Figura) a tre classi, ottenendo discreti valori di R^2 e Q^2 : $R^2(X) = 0.64$, $R^2(Y) = 0.59$, and $Q^2(Y) = 0.39$. Da questo modello è stato quindi possibile ottenere gli scores delle VIP ed i relativi coefficienti di regressione, permettendo in tal modo di identificare i metaboliti più importanti nel discriminare i 3 gruppi (Tabella 5).

Abbiamo quindi misurato tramite il software Chenomx NMR la concentrazione relativa dei metaboliti individuati e ne abbiamo confrontato le concentrazioni medie utilizzando ANOVA ad una via. Quattro metaboliti hanno mostrato una differenza statisticamente significativa all'analisi univariata: 2-OH-butirrato, glicina, metilmalonato e Mio-Inositolo (Figura 6). In dettaglio, il Gruppo C presentava una concentrazione minore di 2-OH-butirrato e più alti livelli di glicina e mio-inositolo, mentre il metilmalonato risultava aumentato nel Gruppo B. Valutando le loro sensibilità e specificità mediante curve ROC, 2-OH-butirrato, glicina, e mio-inositolo hanno dimostrato di poter distinguere i pazienti del Gruppo C dai pazienti del Gruppo B e dai controlli sani con un $AUC > 0.80$.

Inoltre, applicando una regressione PLS abbiamo evidenziato una correlazione tra le variazioni dei metaboliti e lo SR longitudinale, utilizzato come variabile Y nella nostra analisi, con buoni valori di R^2 e Q^2 ($R^2(X) = 0.750$, $R^2(Y) = 0.746$ e $Q^2(Y) = 0.587$).

Figura 6. Metaboliti risultati significativamente differenti all'ANOVA

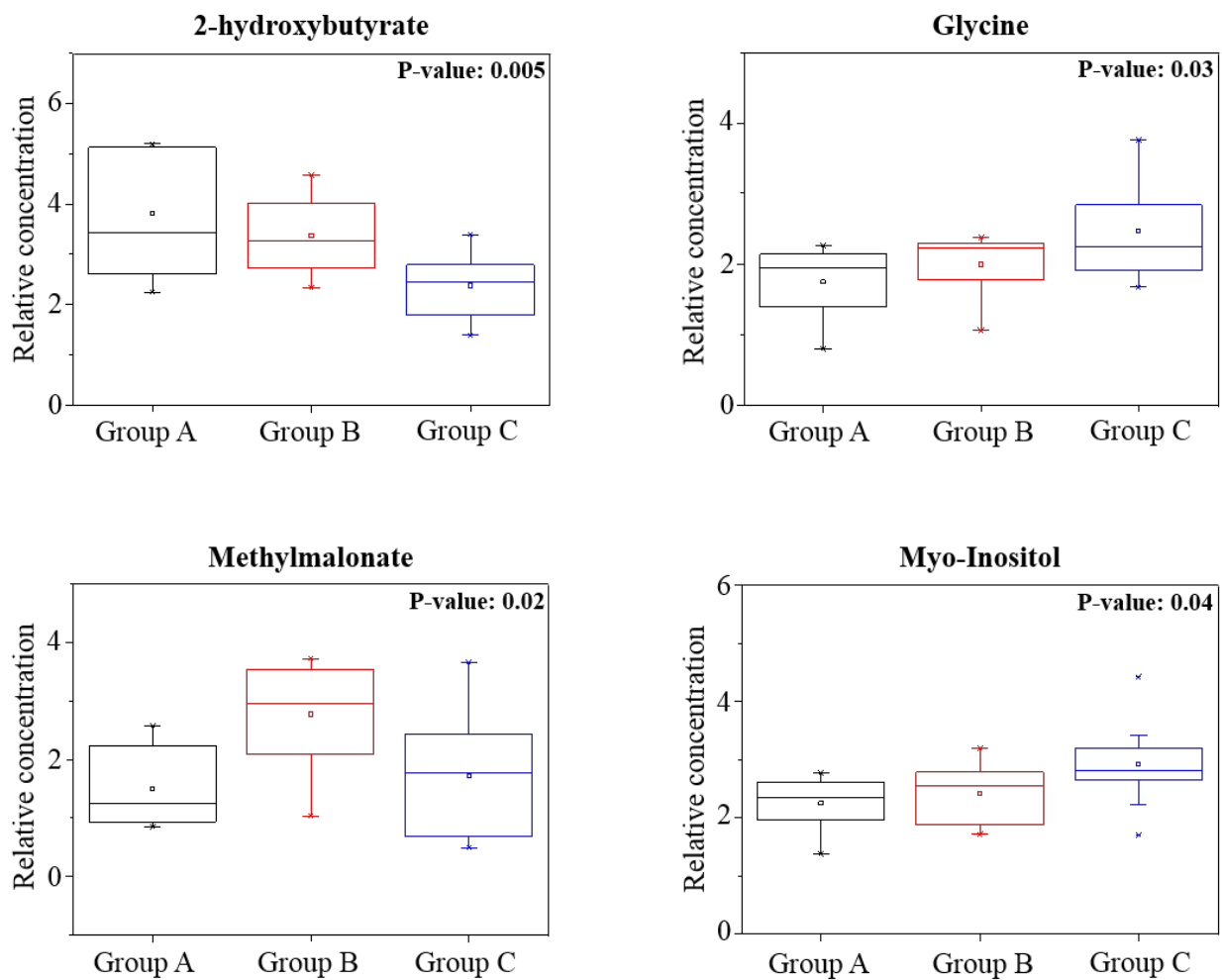


Tabella 6. Attribuzioni e relativi coefficienti delle VIP individuate

Class	Variables	VIP	Coefficient values			Metabolites
			Group A	Group B	Group C	
Group A	1,94	2,46	0,14	-0,07	-0,06	Acetate
	0,9	2,40	0,07	0,05	-0,11	2-hydroxybutyrate
	0,98	2,27	0,11	-0,02	-0,08	Leucine/Isoleucine
	0,94	1,92	0,08	-0,01	-0,07	Leucine/Isoleucine
	1,66	1,88	0,05	0,03	-0,08	2-hydroxybutyrate/Leucine
	1,18	1,67	0,09	-0,04	-0,04	3-hydroxybutirate/ Fucose
	1,46	1,52	0,06	-0,01	-0,05	Alanine/Isoleucine
	1,5	1,44	0,04	0,03	-0,06	Alanine/Isoleucine
	2,42	1,26	0,06	-0,06	0,01	3-hydroxybutirate/Glutamina
	1,1	1,22	0,05	0,01	-0,05	3-methyl-2-oxovalerate
	1,7	1,20	0,04	-0,05	0,01	2-hydroxybutyrate
	1,22	1,18	0,04	-0,05	0,01	3-hydroxybutirate/ Fucose
Group B	3,38	3,45	-0,22	0,13	0,08	Proline/Methanol
	3,9	2,12	-0,08	0,07	0,01	Glucose
	3,22	1,78	-0,05	0,11	-0,06	Glycero-3-phosphocholine
	3,94	1,76	-0,06	0,07	-0,01	Glucose/Creatine
	1,9	1,71	-0,07	0,11	-0,04	4-aminobutyrate
	3,42	1,54	0,03	0,08	-0,10	Glucose
	3,74	1,45	-0,01	0,01	0,00	Glucose
	1,26	1,44	-0,04	0,09	-0,05	Methylmalonate
	1,86	1,25	-0,01	0,06	-0,05	4-aminobutyrate
	2,34	1,17	-0,03	0,07	-0,04	3-hydroxybutirate/Glutamate
	3,98	1,07	-0,08	0,04	0,04	2-hydroxybutyrate
	2,7	1,01	-0,07	0,05	0,02	Citrate
Group C	1,34	4,43	0,00	-0,23	0,22	Lactate
	3,7	3,05	-0,15	0,01	0,12	Glucose
	3,66	2,52	-0,12	-0,02	0,13	Glucose/ Glycero-3-phosphocholine
	3,62	2,50	-0,11	-0,03	0,13	Myo-Inositol/Glycero-3-phosphocholine
	3,58	2,40	-0,07	-0,05	0,11	Myo-Inositol/Glycine
	3,82	1,94	-0,03	-0,06	0,08	Glucose/guanidoacetate
	4,14	1,65	0,00	-0,09	0,08	Lactate
	3,3	1,51	-0,03	-0,05	0,07	Myo-Inositol/Glycine/OTMA
	4,02	1,48	-0,08	0,01	0,06	2-hydroxybutyrate
	2,06	1,36	-0,06	-0,04	0,10	N-acetyl groups
	4,06	1,09	-0,05	-0,01	0,05	Myo-Inositol/Creatinine
	3,14	1,02	-0,08	0,03	0,04	Methylmalonate

Discussione

Il nostro lavoro ha avuto come base l'osservazione, sempre più frequente in letteratura negli ultimi anni, dell'importanza delle alterazioni del metabolismo energetico nella genesi e nella progressione dello SC[20]. Come già anticipato nell'introduzione, tali alterazioni sono difficilmente quantificabili *in vivo* e i dati disponibili sono fondamentalmente indiretti. Le poche metodiche in grado di fornire stime precise delle condizioni metaboliche del miocardio (come la SPECT) sono nella gran parte dei casi estremamente complesse e costose, rallentando la progressione della ricerca in tal senso.

La metabolomica, per le peculiarità che la caratterizzano, si presenta come lo strumento potenzialmente ideale per la valutazione delle alterazioni presenti nei pazienti in varie fasi di SC[59,60].

In accordo con questa valutazione abbiamo deciso di verificare se fosse possibile individuare un pattern metabolico specifico delle condizioni di SC. A tale fine, abbiamo arruolato un gruppo di pazienti con patologia in fase avanzata confrontandolo con soggetti sani e con un gruppo di pazienti che avevano sofferto un pregresso episodio di SC ma in fase di stabilità clinica ed emodinamica al momento dell'arruolamento.

Il muscolo cardiaco, per la peculiarità della funzione svolta, ha un consumo di ATP estremamente elevato[34]; il mantenimento della sua funzione meccanica richiede un adattamento del metabolismo che, almeno in linea teorica, dovrebbe essere tale da poter essere rilevato anche mediante una valutazione effettuata sul sangue periferico.

L'analisi metabolomica si era già dimostrata in grado di fornire informazioni sullo stato funzionale del miocardio in altre condizioni patologiche. In un lavoro pubblicato nel 2005 da Sabatine e collaboratori su *Circulation* era stata valutata la possibilità di identificare specifiche alterazioni

metaboliche in grado di consentire una stratificazione diagnostica non invasiva da prelievi di sangue periferico di soggetti nei quali era stata dimostrata ischemia inducibile alla SPECT nel corso di un test ergometrico[61].

Ancora, la combinazione della metabolomica e dell'analisi proteomica è stata utilizzata nello studio della fibrillazione atriale; il contributo dei processi di rimodellamento elettrico, strutturale e funzionale all'auto-perpetuazione di questa aritmia è ormai ben noto. Al contrario, il ruolo delle alterazioni metaboliche nel miocardio è stato studiato solo parzialmente. La $^1\text{H-NMR}$ è stata utilizzata per analizzare campioni di tessuto atriale umano ottenuti da gruppi di pazienti in ritmo sinusale e da pazienti con fibrillazione atriale persistente sottoposti a chirurgia cardiaca[62]. Nei pazienti aritmici si è rivelato un aumento del β -idrossibutirrato, il substrato fondamentale del metabolismo dei corpi chetonici, in aggiunta ad un aumento di aminoacidi chetogenici e di glicina.

Recentemente un gruppo italiano ha effettuato uno studio su pazienti affetti da scompenso cardiaco cronico, correlandone la fingerprint metabolica ai valori di Pro-BNP e alla Classe NYHA, concludendo che il metabolismo miocardico dei pazienti affetti dalla patologia in esame è identificabile rispetto a quello dei soggetti sani, ma che non varia in relazione alla gravità del quadro clinico[63].

Al contrario, Du e collaboratori[64] hanno pubblicato un lavoro molto simile al nostro, utilizzando come marker di performance miocardica i livelli di Myocardial Energy Expenditure (MEE), un parametro correlato alla ridotta frazione di eiezione e derivato ecocardiograficamente secondo la formula:

$$MEE \text{ (kcal/min)} = LV \text{ circumferential end-systolic wall stress (cESS)} \times LVET \times LV \text{ stroke volume (LVS)} \times HR \times 4.2 \times 10^{-4}.$$

In base ai valori di MEE i pazienti sono stati classificati in 3 gruppi di crescente gravità, ognuno dei quali caratterizzato da una specifica fingerprint metabolica dopo filtraggio OSC sui dati grezzi; le VIP più importanti nel discriminare il gruppo a più elevati MEE (maggiore gravità) sono risultate essere il 3OH-butirrato, l'acetone ed il succinato. Purtroppo i MEE, come si può osservare dalla formula, vengono calcolati dallo stroke volume e dalla FC, due parametri estremamente variabili; inoltre gli indici derivati dalla funzione regionale e globale del ventricolo sinistro non sono molto sensibili poiché fortemente dipendenti dalle condizioni di pre- e post-carico, al contrario dei parametri di deformazione miocardica[57].

I risultati che presentiamo suggeriscono che la metabolomica è in grado non solo di discriminare i soggetti sani da quelli affetti da SC ma anche di identificare un profilo metabolico specifico di quei pazienti che, pur essendo in compenso emodinamico, presentano alterazioni strutturali e/o funzionali del muscolo cardiaco dimostrate ecograficamente.

I 3 gruppi presi in esame hanno mostrato un grado di funzione sistolica decrescente fino alla disfunzione grave rappresentata dai pazienti del Gruppo C, passando per lo stadio intermedio del Gruppo B. Tale distinzione già documentata dalla misurazione della LVEF è stata confermata, con più sensibilità, dagli indici TDI e STI. Fra questi, lo SR longitudinale ottenuto mediante tecnica ST si è dimostrato un parametro fortemente sensibile, in linea con quanto recentemente dimostrato in pazienti ischemici dove è stato dimostrato essere un forte predittore indipendente di morte e ricovero per SC[65]; per tale ragione, proprio i valori di SR longitudinale sono stati utilizzati come Variabile dipendente nell'analisi multivariata, allo scopo di identificare le co-variazioni metaboliche associate alle variazioni della capacità contrattile delle fibre miocardiche.

I risultati dello studio, nel loro insieme, suggeriscono fortemente il ruolo di un'alterazione metabolica non solo nei soggetti con scompenso acuto, ma anche in quei pazienti che si trovino in buon equilibrio emodinamico, confermando le rare segnalazioni precedentemente comunicate in

letteratura[66-70]. Inoltre essi prefigurano la futura, possibile, utilizzazione di tali pattern metabolici per test diagnostici o di screening non invasivi.

A questo proposito è bene ricordare come molti autori ritengano che gli adattamenti attuati da muscolo cardiaco per mantenere la contrattilità a livelli sufficienti a garantire una normale perfusione tissutale non costituiscano un mero epifenomeno della patologia ma possano essere uno dei fattori che ne determinano la progressione[71,72].

L'individuazione delle vie metaboliche implicate in tali meccanismi appare dunque di fondamentale importanza per meglio comprendere la fisiopatologia dello SC e per poter individuare nuovi target terapeutici.

Ed è proprio sul versante terapeutico che vari autori hanno dimostrato un incremento della funzione miocardica conseguente all'utilizzo di terapie metaboliche. Nel 2008, ad esempio, Scognamiglio e collaboratori hanno dimostrato un miglioramento degli indici di funzione sistolica in un gruppo di pazienti diabetici con disfunzione ventricolare sinistra di grado lieve-moderato in seguito ad assunzione di un integratore di aminoacidi per 6 mesi rispetto ad un gruppo di controllo a cui è stato somministrato placebo[73].

Anche l'evidenza di uno switch genico verso un fenotipo metabolico di tipo fetale (quindi con maggiore utilizzo della via glicolitica rispetto a quella di ossidazione degli acidi grassi) osservato in soggetti scompensati[71,74,75] sottolinea l'importanza che riveste il metabolismo energetico miocardico nell'adattamento alle alterate condizioni emodinamiche.

Proprio il grande numero di dati forniti dall'analisi metabolomica potrebbe consentirci di implementare la nostra conoscenza riguardo alle vie metaboliche implicate nella risposta adattativa del miocardio "insufficiente" e nel loro esaurimento. I metaboliti identificati mediante il modello OPLS-DA risultano essere coinvolti nelle vie metaboliche relative alla produzione e/o all'utilizzo di energia. Nello SC cronico i livelli totali di creatina si riducono e questo determina un ulteriore

riduzione del rapporto Fosfocreatina (PCr) : ATP [67], che correla con la classe NYHA[69] e con gli indici di funzione sistolica e diastolica[76]. Le evidenze raccolte fino a questo momento suggeriscono che nella progressione verso l'insufficienza cardiaca si verifichino, in sequenza, i seguenti eventi: la concentrazione di PCr si riduce, come osservato nell'ipertrofia miocardica e nello SC, a causa del mismatch tra necessità di ATP e sua produzione. Questo evento è seguito da una caduta nei livelli di creatina di oltre il 60% e da una riduzione della [ATP][77]. La perdita di creatina è miocardio-specifica ed è di circa un ordine di grandezza più veloce rispetto a quella di ATP[77]. Nel miocardio insufficiente, l'ATP si riduce lentamente e progressivamente fino a un valore pari a circa il 70 - 75% dei valori normali. Precocemente nell'evoluzione dello SC, la concentrazione di ADP (e di fosfato inorganico) aumenta ma, col tempo, così come le concentrazioni assolute di ATP, anche l'ADP e la creatinina si riducono e il rapporto [ATP]:[ADP] ritorna prossimo ai valori normali; quanto a lungo possa essere mantenuta questa forma di compenso non è al momento noto.

La creatina è sintetizzata principalmente nel fegato e nel pancreas per l'azione di due enzimi, la arginina:glicina aminotransferasi e la guanidinoacetato metiltransferasi; in dettaglio, la glicina è il precursore del guanidino-acetato, da cui poi verrà sintetizzata la creatinina[78]. Ruiz-Maena e coll. hanno dimostrato un effetto protettivo esercitato dalla glicina nei confronti dei mitocondri miocardici in corso di ischemia/riperfusion e di altre situazioni con sovraccarico sarcoplasmatico di calcio[79]; inoltre, vari lavori suggeriscono un ruolo di questo aminoacido nel mantenimento delle capacità ossidative mitocondriali sia delle cellule neoplastiche [80] che di quelle muscolari sottoposti a varie forme di stress[81]. Il riscontro di aumentati livelli di glicina nei pazienti del Gruppo C rispetto agli altri due, con valori intermedi nel Gruppo B, sembrerebbe poter essere spiegato come una forma di difesa attuata dall'organismo dei pazienti scompensati nel tentativo di salvaguardare la produzione di energia a livello miocardico. Una conferma a questa ipotesi

sembrerebbe venire dal lavoro di Cullen, che ha dimostrato un incremento dell'espressione dell'mRNA dell'arginina:glicina aminotransferasi nei cuori di pazienti scompensati, indice di un possibile incremento della sintesi locale di creatinina[82]; altrettanto interessante è l'osservazione che l'espressione di tale gene ritorna a livelli normali al ripristino del compenso emodinamico, suggerendo una correlazione tra livello di attività di tale enzima e gravità dello SC.

Il Gruppo C è risultato caratterizzato anche da aumentati livelli di mio-inositolo, componente fondamentale della membrana cellulare che agisce anche come secondo messaggero intracitoplasmatico[83]. Un rapido turnover del mio-inositolo e dei suoi metaboliti fosfati è stato identificato in seguito ad attivazione adrenergica[84] ed è associato ad incremento del calcio sarcoplasmatico[85] e allo sviluppo di cardiomiopatia nel ratto[85,86].

Nello stesso gruppo di pazienti è stato riscontrato un livello relativamente più basso di 2-OH-butilirato. In letteratura sono presenti dati contrastanti relativi a questo composto; Alexander e coll hanno trovato aumentati livelli di questo composto in pazienti affetti da cardiomiopatia dilatativa primitiva [87]. Al contrario il gruppo coordinato da Psychogios, in un lavoro che aveva come intento quello di fornire una visione completa di tutti i metaboliti individuabili nel siero umano, ha riportato valori più alti nei soggetti sani rispetto a quelli di pazienti affetti da SC[88].

L'ultimo composto, il metilmalonato, è risultato più alto nei pazienti del Gruppo B rispetto ai soggetti degli altri due gruppi. Kang[89] e Chung[90], rispettivamente nel 2011 e nel 2012, ne avevano dimostrato la presenza nelle urine di pazienti affetti da SC. Il metilmalonato è un intermedio di una delle vie anaplerotiche e, in quanto tale, contribuisce a mantenere l'efficienza del ciclo di Krebs; Russel ha dimostrato sia una correlazione diretta tra efficacia del ciclo degli acidi tricarbossilici e funzione sistolica[91] sia che modificazioni nel ciclo di Krebs precedono il deterioramento della funzione sistolica stessa [92]. In base a questi dati si potrebbe ipotizzare che nei pazienti con SC in fase di equilibrio emodinamico l'incremento dei livelli di metilmalonato sia

l'espressione di un'attivazione della via anaplerotica nel tentativo di mantenere una buona produzione di energia chimica attraverso la via del ciclo dell'acido citrico e che proprio questa capacità possa contribuire, almeno in parte, a giustificare la buona capacità funzionale e il compenso emodinamico di questi pazienti.

In conclusione, questo approccio sembrerebbe essere un metodo sensibile, in grado di distinguere non solo i controlli sani dai pazienti ma anche, tra questi, quelli con maggiore compromissione della performance cardiaca. L'identificazione di una fingerprint metabolica di soggetti affetti da alterazioni della funzione sistolica del ventricolo sinistro pur se asintomatici e con livelli di BNP non diversi da quelli dei controlli sani, vista la precocità delle modificazioni del metabolismo rispetto a quelle della contrattilità [93,94] suggerisce la possibilità di poter utilizzare la metabolomica per individuare precocemente l'insorgenza o la progressione di un deficit di funzione del ventricolo sinistro in soggetti completamente asintomatici e ben prima di una riduzione significativa della LVEF.

Inoltre i dati fisiopatologici derivabili dall'analisi metabolomica potrebbero consentire di individuare nuove strategie non solo diagnostiche ma anche terapeutiche.

STUDIO DEL PROFILO METABOLICO SU SANGUE CORONARICO DI PAZIENTI SOTTOPOSTI A PCI ELETTIVA

Introduzione

Le malattie cardiovascolari (MCV) rappresentano attualmente la prima causa di mortalità nei paesi industrializzati e si prevede che lo diventino anche nei paesi in via di sviluppo entro il 2020[95]. Fra le MCV, la cardiopatia coronarica (CAD) rappresenta la condizione più comune ed è associata ad elevata mortalità. Si ritiene che la frequenza della CAD debba accelerare nel prossimo decennio, a causa dell'invecchiamento della popolazione e dell'aumento in tutto il mondo di obesità, diabete mellito di tipo 2 e sindrome metabolica. A tutto ciò si assocerà un'aumentata incidenza dei fattori di rischio CV tra le giovani generazioni[96].

La presenza di CAD comporta 2 processi distinti: da un lato la progressione costante e irreversibile dell'aterosclerosi, che conduce, nell'arco di decenni, ad un progressivo restringimento del lume vasale; dall'altro, un meccanismo dinamico e potenzialmente reversibile che può precipitare improvvisamente in un'occlusione coronarica parziale o totale (trombosi, vasospasmo o entrambi). In generale, la componente aterosclerotica è predominante nelle lesioni responsabili dell'angina stabile cronica, mentre la trombosi coronarica rappresenta la causa primaria della maggior parte delle sindromi coronariche acute (SCA)[97,98].

La cardiopatia ischemica cronica

L'estrinsecazione clinica tipica della CAD cronica è l'angina stabile; si tratta di una sindrome clinica caratterizzata da discomfort toracico, irradiato alla mandibola, alla spalla, al dorso o alle braccia, tipicamente provocato dallo sforzo fisico o dallo stress emotivo, attenuato dal riposo o dalla nitroglicerina. L'importanza della CAD nella società contemporanea è testimoniata dal numero quasi epidemico di persone che ne sono afflitte. In accordo con le statistiche dell'American Heart Association (AHA) del 2010, la prevalenza di angina negli USA è del 4,6% e colpisce il 58% dei pazienti affetti da CAD[99].

Le varie presentazioni cliniche della CAD sono associate con i differenti meccanismi sottostanti, che includono principalmente: 1) ostruzione delle arterie epicardiche provocata dalla presenza di una placca; 2) spasmo focale o diffuso di arterie epicardiche normali o affette da malattia aterosclerotica; 3) disfunzione microvascolare; 4) disfunzione ventricolare sinistra provocata da precedente infarto miocardico e/o ibernazione.

Il cuore è un organo aerobio che ricava l'energia necessaria per svolgere il suo lavoro quasi esclusivamente dall'ossidazione di substrati energetici. Il suo rifornimento di O_2 e sostanze nutritive avviene grazie al flusso arterioso attraverso la circolazione coronarica e i 3 maggiori determinanti del consumo miocardico di O_2 sono la frequenza cardiaca, la contrattilità miocardica e la tensione parietale.

L'ischemia si realizza ogni qualvolta si verifichi uno squilibrio tra apporto ematico coronarico e richiesta di O_2 (MVO_2) e metaboliti da parte del miocardio. Da un punto di vista fisiopatologico, infatti, è possibile distinguere due tipi di ischemia miocardica: da ridotto apporto e da aumentata richiesta[100]. L'ischemia miocardica da ridotto apporto, anche denominata a basso flusso, è secondaria a riduzione o assenza di flusso coronarico dovuta a stenosi fisse (placca stabile) e/o a stenosi dinamiche, cioè ad aumento del tono vascolare coronarico ("vasospasmo"). Dal punto di

vista fisiopatologico, la ridotta perfusione miocardica che si realizza nell'ischemia a basso flusso determina tanto un carente apporto di O_2 quanto una rimozione insufficiente dei metaboliti prodotti dalle cellule miocardiche stesse.

L'apporto miocardico di O_2 è determinato dalla saturazione arteriosa di O_2 , dalla sua estrazione e dal flusso coronarico. In condizioni di riposo sia la saturazione arteriosa di O_2 che la sua estrazione da parte del muscolo cardiaco sono relativamente stabili. In particolare, l'estrazione di O_2 da parte del muscolo cardiaco è molto vicina ai valori massimali già a riposo, per cui un'aumentata richiesta di ossigeno può essere soddisfatta quasi esclusivamente da un incremento del flusso coronarico. La presenza di una lesione stenotica fissa a livello delle arterie coronarie epicardiche determina una riduzione dell'apporto ematico dipendente dal grado di stenosi. La presenza di una stenosi significativa può non essere in grado di produrre ischemia in condizioni di riposo grazie al naturale meccanismo di compenso rappresentato dalla vasodilatazione dei vasi del microcircolo[101]. Per garantire, infatti, una perfusione miocardica adeguata al carico di lavoro entrano in gioco diversi meccanismi di regolazione del flusso coronarico a livello del microcircolo, dove risiede circa il 70-80% delle resistenze coronarie totali a riposo ed agiscono i principali meccanismi di regolazione del flusso in relazione alle variazioni del consumo miocardico di O_2 o della pressione di perfusione. Il microcircolo coronarico è sede attiva di controllo del flusso ematico attraverso numerosi fattori metabolici e miogeni. Le arteriole possono modificare la propria resistenza istantaneamente in modo da mantenere costante la pressione precapillare (autoregolazione coronaria). La risposta miogena delle coronarie alle variazioni della pressione intracoronaria consente, infatti, di ottenere quelle variazioni che sono necessarie a mantenere il flusso costante al variare delle situazioni, attraverso l'azione di fattori sia endogeni che esogeni[102]. Va sottolineato, inoltre, che durante ischemia miocardica le influenze metaboliche locali determinino vasodilatazione massimale dei vasi coronarici di resistenza. La vasodilatazione microvascolare è legata anche ad un aumento della

forza trasversale del sangue circolante che si verifica durante stress e che è in grado di far liberare ossido nitrico (NO) dall'endotelio.

Riportando l'attenzione sulla presenza di lesioni stenosanti dei vasi coronarici epicardici, la presenza di placche aterosclerotiche determina una resistenza al flusso ematico coronarico con conseguente riduzione di quest'ultimo. I determinanti di questa riduzione sono legati principalmente alla geometria della placca: lunghezza, entità (stenosi fisse o dinamiche), rigidità, presenza di trombi piastrinici sovrapposti.

In particolare, questa resistenza al flusso ematico determinata dalla stenosi varia al variare dell'area della sezione trasversa del lume in maniera esponenziale e della lunghezza della stenosi in maniera lineare (formula di Poiseuille). La presenza di placche severe e complicate determina una rapida trasformazione del flusso da laminare a turbolento ed una caduta sostanziale della pressione trans-stenotica. Poiché la riduzione della pressione attraverso la stenosi è proporzionale alla quarta potenza del raggio, anche piccole variazioni del diametro interno possono determinare cali importanti della pressione di perfusione a valle della lesione stenotica. L'aumento del flusso ematico attraverso una stenosi si traduce in aumento del gradiente pressorio trans-stenotico con ridotta pressione di perfusione a valle per cui per ottenere un flusso costante a valle della stenosi, è necessaria una vasodilatazione dei vasi di resistenza post-stenotici che permetta un aumento del flusso proporzionato alle richieste metaboliche del miocardio.

L'aterosclerosi

L'aterosclerosi (ATS) è una malattia cronica fibroproliferativa ed immuno-infiammatoria, multifocale, che colpisce le arterie di grande e medio calibro, causata principalmente da un accumulo di lipidi[98,103].

Numerose e controverse sono le ipotesi formulate nel tentativo di identificare i meccanismi responsabili della comparsa e progressione della malattia aterosclerotica. La teoria più accreditata rimane quella infiammatoria di Russell Ross[104], “the response to injury”, che ipotizza nell’infiammazione il meccanismo mediante il quale i fattori di rischio cardiovascolari evocano una risposta riparativa da parte della parete vascolare, risposta che inizia con l’attivazione endoteliale, per poi progredire e stabilizzarsi con la formazione della placca aterosclerotica.

L’ATS coinvolge diversi processi strettamente interconnessi, includendo i disturbi del metabolismo lipidico, l’attivazione piastrinica, la trombosi, la disfunzione endoteliale, l’infiammazione, lo stress ossidativo, l’attivazione delle cellule muscolari lisce vascolari, l’alterato metabolismo della matrice, il rimodellamento e i fattori genetici[105]. I fattori di rischio giocano un ruolo importante nell’inizio e nell’accelerazione del processo dell’ATS.

Mentre gli eventi precoci nella genesi dell’ateroma coinvolgono principalmente la disfunzione endoteliale, il reclutamento e l’accumulo di leucociti (monociti/macrofagi e neutrofili), l’evoluzione successiva dell’ateroma in lesioni più complesse, coinvolge le cellule muscolari lisce (SMC). Una volta attivate dal danno, dai fattori di crescita o dalle citochine, le SMC subiscono un cambiamento del fenotipo che porta a una cellula in grado di migrare all’interno della tonaca intima e di secernere varie sostanze[106]. Attraverso i fattori di crescita e la stimolazione da parte di citochine, le SMC proliferano e secernono proteine della matrice ed enzimi. Sebbene le lesioni aterosclerotiche complesse contengano SMC, macrofagi carichi di lipidi e linfociti, la SMC è la componente cellulare dominante nelle lesioni de novo e nelle ristensioni intrastent.

Le lesioni aterosclerotiche sono composte sia da elementi cellulari che da matrice extracellulare, che ne costituisce oltre il 50% del volume. Le SMC sono largamente responsabili della produzione delle proteine della matrice che sono per la gran parte costituite da collagene e proteoglicani[107].

La placca vulnerabile è caratterizzata da un ampio core lipidico, un sottile cappuccio fibroso e cellule infiammatorie nella porzione più sottile della superficie del cappuccio⁴⁰. Numerosi studi hanno evidenziato come le metallo proteinasi ed altre sostanze espresse dai macrofagi siano responsabili della degradazione del cap, conducendo ad una placca instabile suscettibile di rottura[108]. La trombosi coronarica spesso si verifica nei siti di rottura o di erosione di placca[109].

La localizzazione dei siti delle lesioni aterosclerotiche, in modo preferenziale a livello della regione prossimale delle arterie dopo i punti di diramazione o biforcazione, dove il flusso si divide, suggerisce inoltre una base idrodinamica nello sviluppo della lesione precoce.

Funzione endoteliale

Inizialmente considerato come una barriera inerte tra sangue e parete del vaso, l'endotelio vascolare è ora riconosciuto come un importante centro di controllo dell'omeostasi vascolare. Le attuali evidenze suggeriscono che lo stato dell'endotelio non è determinato solamente dal carico di fattori di rischio individuali, ma, piuttosto, può essere considerato come un indice integrato di tutti i fattori aterogenici e ateroprotettivi presenti in un individuo, includendo variabili note e ancora non conosciute e la predisposizione genetica. Recenti intuizioni sui meccanismi di base coinvolti nell'aterogenesi indicano che alterazioni della fisiologia endoteliale, comunemente comprese nella dizione di disfunzione endoteliale, rappresentano un primer fondamentale nello sviluppo della malattia aterosclerotica e sono co-responsabili della progressione della placca e dell'insorgenza di malattia conclamata[104,110]. La disfunzione endoteliale è un disordine sistemico che riflette un fenotipo vascolare incline all'aterogenesi e pertanto può essere utilizzato come marker di rischio

CV. In accordo con questa ipotesi, la disfunzione endoteliale è un predittore indipendente di eventi CV, fornendo preziose informazioni prognostiche addizionali rispetto a quelle derivate dalla valutazione dei tradizionali fattori di rischio. Durante le ultime due decadi è divenuto evidente che l'endotelio vascolare è un attivo organo paracrino, endocrino e autocrino, indispensabile per la regolazione del tono vascolare e il mantenimento dell'omeostasi dei vasi.

La regolazione endoteliale di questi processi deriva principalmente dalla produzione di mediatori autocrini e paracrini, inclusi l'NO, le prostaglandine, i fattori di iperpolarizzazione dell'endotelio, l'endotelina, l'angiotensina II e non solo. Queste sostanze provvedono a fornire un bilancio tra vasodilatazione e vasocostrizione, trombosi e anticoagulazione, nonché modulazione dell'infiammazione. Tra questi mediatori il meglio caratterizzato è l'NO[111]. Prodotto costitutivamente dall'NO sintetasi endoteliale (eNOS) o dall'NOS III, l'NO è il più potente vasodilatatore[112]. L'importanza centrale di questa molecola può essere dimostrata dall'ampia varietà di stimoli che ne modificano la produzione o la degradazione[111]. Potenti vasocostrittori, come l'angiotensina II e l'endotelina, antagonizzano le azioni dell'NO determinando nel complesso un'accurata modulazione della funzione vascolare[113]. La produzione costitutiva di NO da parte dell'NOS III contribuisce in maniera fondamentale a molte funzioni dell'endotelio, ma le sue proprietà vasodilatorie sono le più suscettibili di indagine⁴⁹. In soggetti sani, l'attivazione dell'eNOS causa vasodilatazione dei condotti vascolari muscolari e delle resistenze arteriolari. Per contro, nei soggetti con aterosclerosi, la stessa stimolazione produce vasocostrizione paradossale nelle arterie coronarie, indicando una ridotta disponibilità di NO[114,115]. È interessante notare come sia possibile dimostrare la presenza di disfunzione endoteliale in pazienti con fattori di rischio per ATS in assenza di lesioni ateromasiche[116,117]. Queste osservazioni sembrano suggerire che la disfunzione endoteliale sia parte integrante dello sviluppo e della progressione della malattia. In tale ottica, una ridotta biodisponibilità di NO e un incremento della produzione di sostanze

vasocostrittrici potrebbe creare un substrato favorevole per la trombosi e lo sviluppo di aterosclerosi[118].

Un altro aspetto della disfunzione endoteliale è l'incremento dell'infiammazione[105]. Le cellule endoteliali partecipano al reclutamento, adesione e diapedesi dei leucociti all'interno della parete vascolare attraverso la produzione di chemochine, citochine e di fattori di trascrizione intracellulari[119,120]. Questi processi, infatti, risultano centrali per la formazione delle lesioni aterosclerotiche[103]. L'NO antagonizza ognuno di questi processi[121,122], perciò la sua riduzione determina la progressione della lesione attraverso un'incrementata proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce, un'aumentata attivazione piastrinica con possibilità di trombosi ed una possibile stimolazione di neoangiogenesi intravascolare e di alterazioni dei lipidi in senso aterogeno[123]. La disfunzione endoteliale può ridurre la perfusione vascolare, produrre fattori che riducono la stabilità di placca e aumentare la risposta trombotica in caso di rottura della stessa[124,125]. La presenza di disfunzione endoteliale predice la presenza di malattia aterosclerotica significativa[126] e fornisce informazioni prognostiche circa la probabilità di eventi in pazienti con malattia coronarica[127].

Sebbene l'associazione tra i fattori di rischio CV e la patologia aterosclerotica sia ben documentata, i meccanismi attraverso i quali questi fattori inducano la formazione della lesione e conducano agli eventi non è interamente definita. L'osservazione che una parte degli individui non sviluppa manifestazioni aterosclerotiche nonostante la presenza di numerosi fattori di rischio CV suggerisce l'esistenza di una "soglia" che, solo quando superata, determina lo switch da fattore di rischio ad effetto fisiopatologico sfavorevole. Data la sua strategica locazione e le proprietà biologiche, lo strato cellulare endoteliale, che rappresenta una barriera meccanica e biologica tra sangue e parete vascolare, probabilmente funge da mediatore tra fattori di rischio noti e la loro estrinsecazione in forma di patologia vascolare.

La maggior parte, se non tutti, i fattori di rischio correlati all'aterosclerosi e alla mortalità/morbilità CV conducono con il tempo allo sviluppo di disfunzione endoteliale[128]. La maggior parte di questi fattori di rischio, inclusa l'iperlipidemia, l'ipertensione, il diabete e il fumo sono associati ad una iperproduzione di ROS con incrementato stress ossidativo[129]. L'eccessiva produzione di ROS rappresenta un importante processo patologico nell'aterosclerosi ed è incrementata da ciascuno dei costituenti della lesione aterogena[130]. Importanti fonti di ROS sono le cellule muscolari lisce vasali, le cellule endoteliali, i fibroblasti e i leucociti infiltranti[131]. La produzione di ROS colpisce i geni di trascrizione, determina danni a livello del DNA e incrementa la produzione di fattori di trascrizione pro-infiammatori[132]. Reagendo con l'NO, i ROS possono ridurre la disponibilità vascolare e promuovere il danno cellulare[133]. L'incrementato stress ossidativo è considerato, dunque, un importante meccanismo coinvolto nella patogenesi della disfunzione endoteliale e può essere considerato la via comune attraverso la quale i fattori di rischio esplicano la propria azione patogena sull'endotelio[129,134]. Lo stress ossidativo si manifesta quando le sostanze cellulari pro-ossidanti superano le difese anti-ossidanti. A livello intracellulare, il glutathione riveste un ruolo centrale come anti-ossidante e contribuisce ad eliminare i perossidi e gli altri ossidanti, mantenendo in equilibrio lo stato redox di numerose biomolecole. A livello extracellulare, il ruolo maggiore è svolto dalla cisteina e dalla sua forma disolfata, la cistina, che, quando ossidata, può essere utilizzata per la valutazione dello stress ossidativo. Quindi, più bassi livelli di glutathione riflettono un relativo deficit di substrato antiossidante e più alti livelli di cisteina un'iperproduzione relativa di composti ossidanti, entrambe manifestazioni di un maggior stress ossidativo. Precedenti studi hanno mostrato che anormali livelli di aminotioili plasmatici come glutathione e cistina sono associati con alterata funzione endoteliale[135-137]. Un recente studio[138] ha dimostrato che, in pazienti con CAD, l'incrementato stress ossidativo sistemico (minori livelli plasmatici di glutathione e un più alto rapporto cistina/glutathione) è associato a

disfunzione microvascolare coronarica e ad un maggiore contenuto di core necrotico di placca, in maniera indipendente dal carico di placca, dai tradizionali fattori di rischio CV e dall'infiammazione (valutata in termini di PCR ad elevata sensibilità). La presenza di noti fattori di rischio CV, dunque, non è l'unico determinante della disfunzione endoteliale, come dimostrato dall'osservazione che pazienti con normale funzione endoteliale e pazienti con vari stadi di disfunzione endoteliale non necessariamente differiscano nel loro profilo di fattori di rischio[139,140]. In sintesi, esiste una suscettibilità endoteliale ai vari fattori di rischio CV variabile nel singolo paziente, Ciò sottolinea l'importanza, al di là dei fattori locali (forze emodinamiche e shear stress), di altri fattori, tuttora non completamente noti o francamente sconosciuti, necessari per la promozione della disfunzione endoteliale[141].

In sintesi, lo stato della funzione endoteliale rappresenta un indice integrato del rapporto tra carico di fattori di rischio e somma di tutti i fattori vasculoprotettivi in ciascun dato individuo[142]. La presenza di disfunzione endoteliale può essere considerata come una sindrome clinica che è per se associata a una predetta e incrementata probabilità di eventi CV avversi[143,144].

Obiettivi dello studio

Gli obiettivi del nostro studio sono stati fondamentalmente 3: a) valutare se l'applicazione dell'analisi metabonomica a campioni di plasma arterioso prelevati in corso di esame coronarografico fosse sufficientemente sensibile nell'identificare alterazioni metaboliche descrittive dello stato reologico dei vasi in esame; b) identificare e caratterizzare un eventuale pattern metabolico in grado di discriminare i pazienti affetti da cardiopatia ischemica stenotica versus quelli con disfunzione esclusiva del microcircolo; c) verificare se il profilo metabolico ottenuto dall'analisi dei campioni potesse contribuire alla stratificazione del rischio ischemico e ad una migliore definizione delle strategie terapeutiche.

Materiali e Metodo

Popolazione studiata

Sono stati arruolati 11 pazienti con sospetta cardiopatia ischemica (7 uomini/4 donne; età media 66 ± 12.87 ; Tabella 6) afferiti presso il nostro centro per eseguire ecostress con dobutamina o dipiridamolo risultato positivo per ischemia miocardica inducibile. Tutti i pazienti sono stati informati sulle modalità di esecuzione dello studio e hanno rilasciato il loro consenso in forma scritta. I criteri di inclusione prevedevano: età > 18 aa; ecostress positivo per ischemia iducibile; criteri di esclusione: recente PTCA (1 mese per BMS, 1 anno per DES), patologie metaboliche e/o cachetizzanti, malattie autoimmuni, epatopatie. Nella tabella 1 sono riassunti i dati relativi alle caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati nello studio.

Tutti i pazienti sono stati ricoverati e hanno effettuato ECG a 12 derivazioni, prelievi ematici per valutazione di glicemia, funzionalità epatica e renale, assetto lipidico, ecocardiografia mono e

bidimensionale con color Doppler. Gli esami ecocardiografici sono stati condotti secondo le raccomandazioni delle Società Scientifiche di settore.

I pazienti, data l'evidenza di ischemia miocardica inducibile, sono stati avviati a studio coronarografico nel corso del quale è stato effettuato, prima di qualunque procedura sul vaso, un prelievo di sangue coronarico in provetta eparinata. Appena possibile, il campione è stato centrifugato a 4000 rpm per 15' ed aliquotato (700µl) in cuvette che sono state conservate a -80°C fino al momento dell'analisi metabolomica (Vedi Metodo descritto precedentemente).

Prelievi coronarici

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a studio angiografico coronarico con le modalità previste dalle attuali linee guida in materia. L'eparina è stata somministrata in bolo e.v. alla dose iniziale di 100 U/kg di peso corporeo. Sono stati praticati 9 accessi radiali destri, 1 accesso radiale sinistro e 1 accesso femorale destro per effettuare la coronarografia diagnostica. Il mezzo di contrasto utilizzato è stato lo Iomeron.

Tabella 6. Dati antropometrici e caratteristiche cliniche della popolazione studiata

	Gruppo A	Gruppo B	Popolazione completa
	N=6	N=5	N=11
Età (anni)	69 ± 4,55	54,6 ± 12,38	66 ± 12,32
M/F	4/2	3/2	
Altezza (mt)	1,61 ± 0,09	1,65 ± 0,09	1,62 ± 0,085
Peso (Kg)	71,67 ± 9,81	86,4 ± 21,94	78,36 ± 16,51
BMI (Kg/m ²)	27,61 ± 2,59	31,32 ± 5,68	29,30 ± 4,26
BSA (m ²)	1,76 ± 0,16	1,98 ± 0,30	1,85 ± 0,21
PAS	128,33 ± 16,02	133 ± 6,71	129,16 ± 12,04
PAD	75 ± 5,48	81 ± 7,42	77,72 ± 6,52
FC	78,33 ± 15,81	62 ± 5,66	69,69 ± 13,41
GFR (Cockcroft-Gault)	65,50 ± 14,98	64,75 ± 32,37	68 ± 20,13
Fattori di rischio CV			
Diabete	6	3	
Ipertensione arteriosa	5	5	
Ipercolesterolemia	3	3	
Fumo	0	1	
Familiarità	1	0	
AOC AI	1	0	
ATS carotidea	2	3	
CAD nota	3	0	
Terapie			
β-bloccanti	5	4	
ACE-inibitori	3	2	
Sartani	2	4	
Diuretici	1	3	
Antialdosteronici	-	-	
Ca-antagonisti	4	3	
Antiaritmici	-	-	
Aspirina	6	5	
Altri antiaggreganti	6	5	

Tabella 6. Dati antropometrici e caratteristiche cliniche della popolazione studiata

	Gruppo A	Gruppo B	Popolazione completa
	N=6	N=5	N=11
Anticoagulanti	-	-	
Statine	6	5	
Altri ipolipemizzanti	-	1	
Insulina	6	2	
Ipoglicemizzanti orali	2	2	
Digitale	-	-	
Nitrati	1	1	
Altri antipertensivi	-	1	

Risultati

Risultati ecocardiografici ed ecostress

I dati ecocardiografici non hanno mostrato differenze statisticamente significative tra i due gruppi. La funzione sistolica è risultata normale in tutti i pazienti. Tutti i soggetti hanno presentato una disfunzione diastolica di grado lieve- moderato, valutata mediante rapporto E/E'. In 4 pazienti sono state riscontrate alterazioni della cinetica all'esame basale. Nessuno è risultato affetto da valvulopatia severa, ipertrofia miocardica e/o dilatazione ventricolare sinistra.

Coronarografia

Sulla base della coronarografia è stato possibile evidenziare la presenza di una malattia coronarica stenotica in 6 pazienti e l'assenza di coronaropatia angiograficamente evidente in 5 pazienti. Ogni paziente è stato identificato attraverso un numero progressivo da 1 a 11 sulla base dell'arruolamento nello studio. I pazienti 4, 5, 6, 8, 9, 10 hanno mostrato una coronaropatia stenotica mentre i pazienti 1,2, 3, 7 e 11 erano privi di stenosi coronariche ma presentavano un ecostress positivo e una storia clinica di angina tipica; per tale ragione tali pazienti sono stati identificati come portatori di angina microvascolare. Tutti questi pazienti presentavano un blush miocardico 3.

Nove pazienti mostravano una dominanza destra, in un paziente si osservava dominanza bilanciata e in uno dominanza sinistra. Nella popolazione con CAD stenotica erano presenti 2 pazienti con coronaropatia monovascolare, 1 paziente con coronaropatia bivascolare, 1 pazienti con malattia critica del tronco comune e bivascolare, 1 coronaropatia trivascolare e 1 occlusione cronica della coronaria destra.

Di seguito passeremo in rassegna la descrizione angiografica delle lesioni stenosanti dei pazienti con coronarografia positiva (n 6).

Il paziente 4 presentava una stenosi critica del tronco comune all'ostio, nel corpo e alla biforcazione; la discendente anteriore una stenosi ostiale critica e assenza di restenosi intrastent nel tratto distale; nella coronaria destra si osservava un'occlusione cronica nel tratto prossimale (questa riceveva un circolo collaterale eterocoronarico per il ramo discendente posteriore e per il posterolaterale).

Il paziente 5 presentava una stenosi critica marcatamente calcifica sull'arteria discendente anteriore.

Il paziente 6 presentava anch'esso una coronaropatia monovascolare con stenosi critica distale dell'arteria discendente anteriore.

Il paziente 8 presentava una coronaria sinistra diffusamente e marcatamente calcifica, la discendente anteriore aveva una stenosi critica distale e la circonflessa una stenosi critica prossimale in corrispondenza della quale origina un grosso ramo marginale ottuso che presentava a sua volta una stenosi critica ostiale; la coronaria destra era di piccolo calibro e calcifica con stenosi critica nel tratto medio.

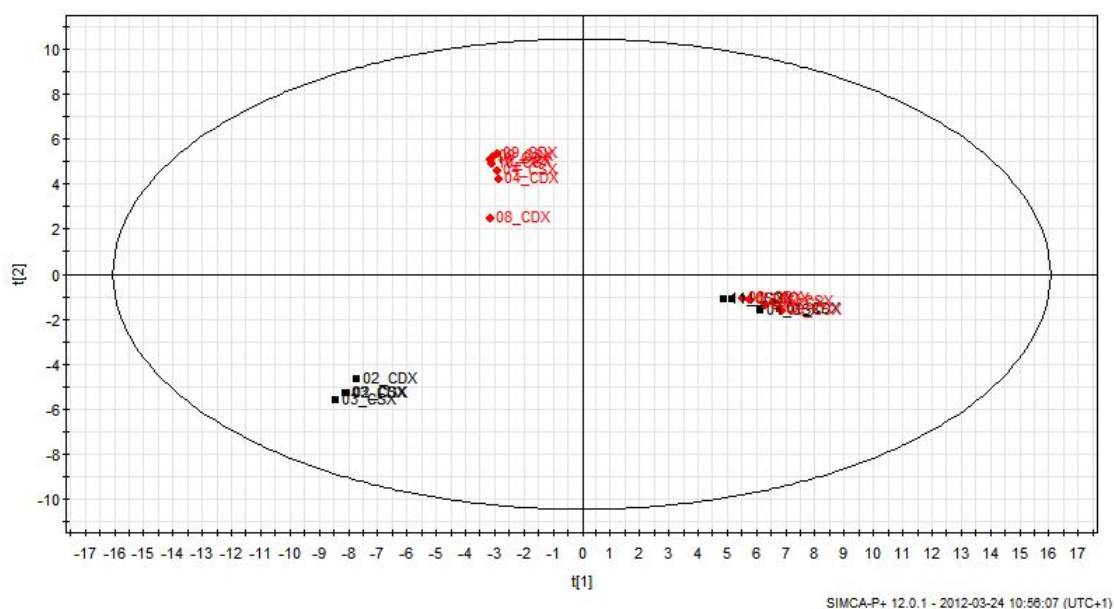
Il paziente 9 presentava una coronaria destra di buon calibro occlusa nel tratto prossimale; un buon circolo collaterale eterocoronarico riperfonde il ramo posterolaterale e la discendente posteriore fino alla crux.

Il paziente 10 presentava una coronaria destra di piccolo calibro diffusamente ateromastica subocclusa nel tratto distale; la discendente anteriore occlusa nel tratto distale.

Metabolomica

Per valutare la presenza di eventuali cluster spontanei all'interno del gruppo dei campioni (costituito dal plasma prelevato nelle due arterie coronarie di ciascun paziente arruolato), abbiamo applicato agli spettri una PCA (Figura 7) che ha mostrato una aggregazione spontanea in 3 gruppi ($R^2=0.829$; $Q^2=0.749$).

Figura 7. Scatter Plot della PCA, con evidenza di una clusterizzazione spontanea in tre gruppi

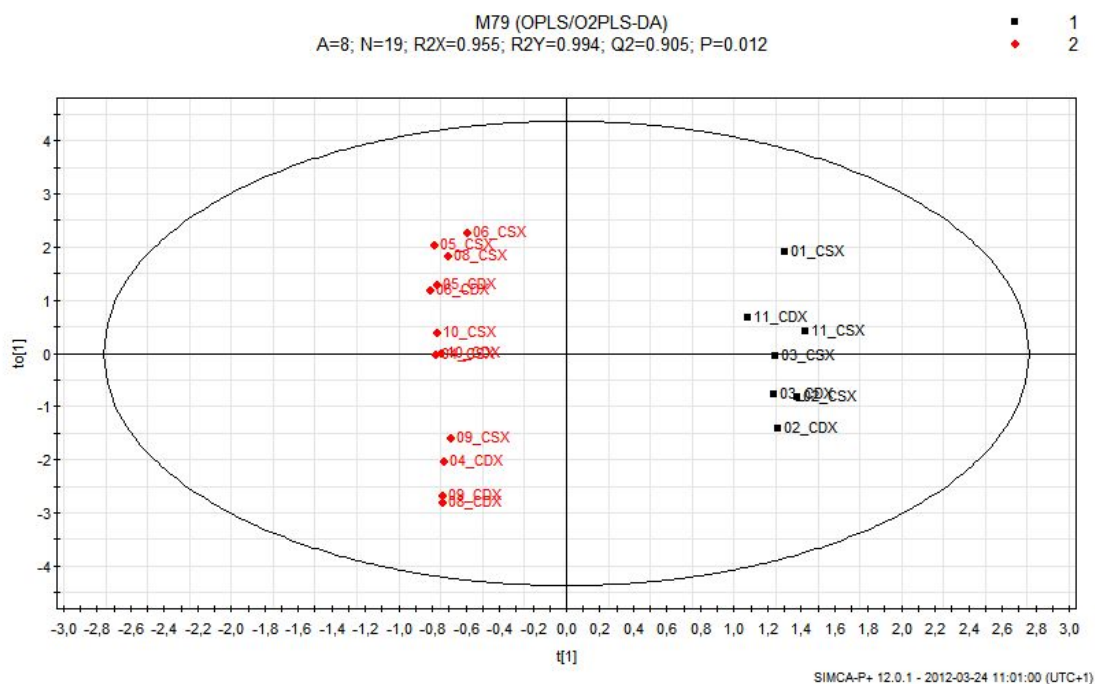


Tali clusters sono risultati essere composti da: 1) pazienti non diabetici con malattia del microcircolo; 2) pazienti diabetici con malattia coronarica lieve (patologia del microcircolo/CAD stenosante monovascolare) e 3) da pazienti diabetici con malattia coronarica severa (trivascolari/CTO). Tuttavia la separazione dei diabetici dai non diabetici, sebbene importante in termini di sensibilità della metodica, ha indotto a considerare la possibilità che l'analisi dei dati potesse essere inficiata dalle differenze metaboliche sistemiche esistenti tra diabetici e non diabetici e che questa preponderante differenza potesse rendere non evidenti eventuali altre alterazioni esistenti e legate a fattori locali, o anche sistemici, ma più intimamente collegati alla patologia in studio.

Una PLS-DA effettuata ad hoc ha confermato i dubbi circa la possibilità che le differenze osservate potessero essere fortemente influenzate dalla presenza e dal grado di severità della patologia diabetica. Per tale ragione, abbiamo valutato quali fossero le VIP maggiormente implicate nella separazione dei pazienti diabetici da quelli non diabetici e, ottenuta conferma dai dati presenti in letteratura, abbiamo escluso dall'analisi le zone dello spettro responsabili di tale clusterizzazione (δ 3.34 - δ 3.98), costituite fondamentalmente dalla zona del glucosio e dei suoi metaboliti.

Dopo tale normalizzazione, abbiamo effettuato una PLS-DA a due classi per verificare l'ipotesi che il plasma proveniente da pazienti con CAD stenosante (Gruppo A) differisse da quello dei pazienti affetti da patologia del microcircolo (Gruppo B), ottenendo una separazione dei campioni con buoni valori di R^2 (0.983), di Q^2 (0.885) e di p (0.03). Per ottimizzare la discriminazione, riducendo gli effetti di eventuali fattori confondenti, abbiamo applicato una OPLS-DA che ha consentito di creare un modello meglio definito e statisticamente più significativo ($R^2=0.994$; $Q^2=0.905$; $p=0.01$; Figura 8). In tal modo è stato possibile identificare due pattern metabolici differenti corrispondenti a due distinte entità fisiopatologiche: la CAD stenosante e l'alterata funzione del microcircolo.

Figura 8. Scatter Plot della OPLS-DA

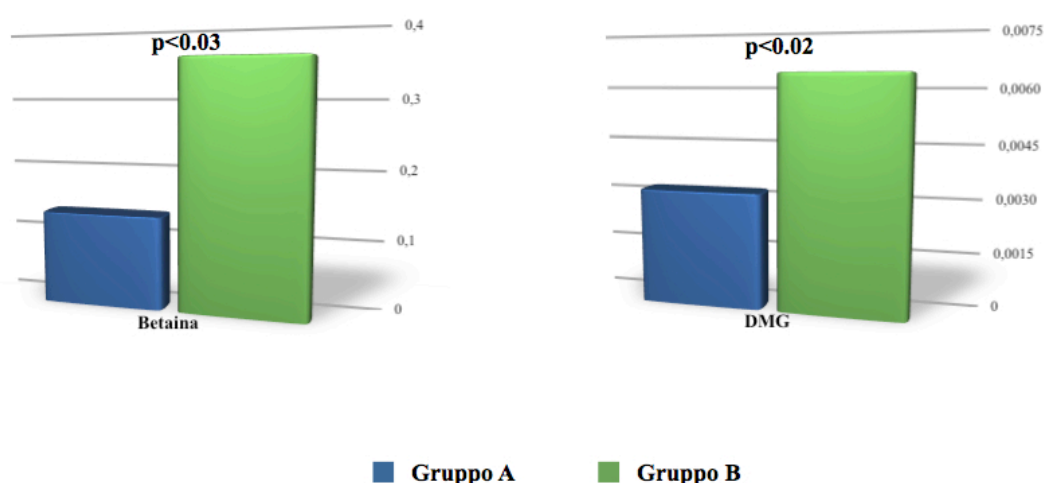


L'analisi delle VIP ha consentito di individuare un ristretto numero di variabili maggiormente responsabili della clusterizzazione osservata; l'identificazione dei metaboliti corrispondenti è stata effettuata utilizzando le librerie del software Chenomx NMR suite 7.1 (Chenomx Inc.) e i dati presenti in letteratura. Nel dettaglio, i metaboliti individuati sono stati: l'alanina, la betaina, il citrato, il lattato, il malonato, la N, N- dimetilglicina (DMG), il piruvato ed il succinato.

L'analisi univariata effettuata su tali molecole ha evidenziato la presenza di differenze statisticamente significative nei livelli di betaina e DMG tra i due gruppi identificati con l'OPLS-DA; nello specifico, le concentrazioni di entrambi i metaboliti sono risultati essere più elevate (rispettivamente $0.3573 \pm 0.2324 \mu\text{M}$ vs $0.1340 \pm 0.1040 \mu\text{M}$, $p < 0.03$, e $0.0064 \pm 0.0032 \mu\text{M}$ vs $0.0030 \pm 0.0014 \mu\text{M}$, $p < 0.02$) nel gruppo di pazienti con coronarie angiograficamente normali rispetto a quelli con patologia stenotica (Figura 9).

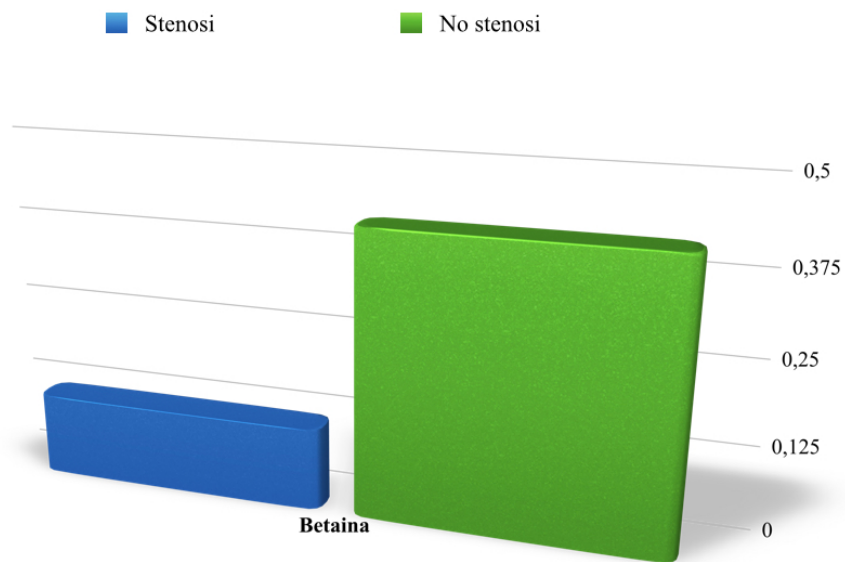
E' necessario specificare, tuttavia, che la discriminazione nei due gruppi è dovuta alla covariazione dei metaboliti individuati, piuttosto che alla semplice differenza di concentrazioni tra gli stessi metaboliti considerati singolarmente, sebbene il peso nel determinare la clusterizzazione sia tra essi diverso.

Figura 6. Valori di Betaina e DMG nei due gruppi



Abbiamo quindi valutato se esistessero differenze tra i vasi con malattia stenotica rispetto a quelli privi di stenosi; da tale analisi è emersa una differenza statisticamente significativa solo per quanto riguarda i livelli di Betaina (Figura 10, p=0.0001), che hanno mostrato una correlazione diretta con i livelli di lattato (r=0.5586, p=0.0129) e piruvato (r=0.7222; p=0.0005). Lo step successivo è stato quello di valutare la sensibilità/specificità dei livelli di betaina nel discriminare le coronarie malate da quelle “sane” mediante una curva ROC, che ha mostrato buoni valori di AUC (0.889) con una p=0.0042, una sensibilità del 77.78% ed una specificità del 70%.

Figura 10. Livelli di betaina nelle coronarie con stenosi rispetto a quelle angiograficamente normali (p=0.0001)



Discussione

Il presente studio ha avuto come obiettivo principale quello di valutare se, attraverso una metodica sensibile quale la metabolomica, fosse possibile individuare delle differenze metaboliche in grado di rendere conto, almeno parzialmente, di due distinte estrinsecazioni della malattia aterosclerotica coronarica, la CAD stenotica e la malattia del microcircolo. Recenti lavori fisiopatologici incentrati sullo studio dei meccanismi di base implicati nell'aterogenesi hanno indicato che le alterazioni della funzione endoteliale rappresentano un momento chiave nello sviluppo dell'aterosclerosi e rivestono un ruolo fondamentale sia nella progressione della placca che nell'evoluzione verso le complicanze della malattia aterosclerotica stessa[104,110].

Precedenti lavori hanno dapprima affermato[145], quindi negato[146] la possibilità di utilizzare l'analisi metabolomica per individuare la presenza di malattia coronarica e definirne la severità; tuttavia questi studi sono stati condotti su sangue venoso periferico e nell'ottica di un possibile ruolo diagnostico dell'analisi metabolomica alternativo, se non sostitutivo, rispetto allo studio coronarografico. Il nostro lavoro è invece nato in ambito cardiologico-emodinamico e ne ha mutuato le metodiche, utilizzando la metabolomica, almeno in questa prima fase, come strumento di indagine scientifica ed approfondimento fisiopatologico piuttosto che come possibile tool diagnostico.

Fin dalla prima osservazione della presenza di disfunzione endoteliale a livello di arterie epicardiche aterosclerotiche⁵¹, un numero crescente di lavori si è incentrato sulla possibilità di individuare in modo sempre più precoce e meno invasivo i segni di tale alterazione[147]; tuttavia, proprio questa “deriva” in senso diagnostico ha distolto spesso l'attenzione dall'importanza dell'endotelio e della sua funzione intesa come sede e substrato principali delle manifestazioni fisiopatologiche della malattia aterosclerotica e, quindi, come target privilegiato per la comprensione dei fattori che portano all'evoluzione della patologia e alla sua estrinsecazione in

forma stabile piuttosto che instabile o con compromissione maggiore del microcircolo rispetto alle arterie epicardiche o, ancora, al coinvolgimento di entrambi.

In questa ottica, abbiamo ideato un protocollo che consentisse la possibilità di effettuare una valutazione del microambiente coronarico da correlare al grado di compromissione dell'anatomia e della funzione coronarica in soggetti sicuramente affetti da CAD, essendo risultati positivi per ischemia inducibile ad un test sensibile come quello ecocardiografico con stress farmacologico.

Sebbene i fattori di rischio per l'aterosclerosi (ATS) siano fondamentalmente sistemici, il loro switch da rischio potenziale a lesione anatomopatologica richiede necessariamente una alterazione della funzione endoteliale locale[141,147] che, in cronico, abbiamo ipotizzato possa determinare una modificazione del microambiente rilevabile con una metodica sensibile quale la metabolomica[59,60].

Il modello OPLS-DA ha consentito di confermare questa ipotesi, dimostrandosi in grado di distinguere con ottimi valori di significatività i campioni di sangue arterioso provenienti dalle coronarie di pazienti con due diverse manifestazioni di CAD, l'una stenotica, l'altra determinante alterazioni diffuse a carico del microcircolo.

Tale distinzione in gruppi è sottesa dalla presenza di due diverse manifestazioni della stessa patologia, probabilmente dovute ad una diversa modulazione della cascata fisiopatologica che conduce alla lesione anatomopatologica. E' significativo che, considerando i singoli pazienti del gruppo A, i campioni relativi alle due coronarie mostrino una spiccata variabilità nella distribuzione nello scatterplot ed una certa tendenza alla clusterizzazione in sottogruppi, suggerendo l'esistenza di fattori locali in grado di differenziare i due prelievi sebbene provenienti dallo stesso individuo; tale fenomeno non si verifica nel Gruppo B, rafforzando l'idea che la variabilità osservata nell'ambito del Gruppo A possa essere dovuta al diverso grado di patologia coronarica esistente nei due vasi.

L'analisi delle VIP e l'identificazione dei metaboliti corrispondenti è stata la naturale fase successiva del nostro lavoro. Le molecole individuate possono essere fondamentalmente inquadrare in due gruppi: l'uno che accoglie i metaboliti implicati nel metabolismo energetico (alanina, citrato, lattato, malonato, piruvato e succinato) e l'altro relativo a quelli che hanno un ruolo nella funzione/disfunzione endoteliale.

Sebbene, come già detto più volte, la differenziazione dei pattern metabolici dipenda dal variare di queste molecole allo stesso modo in tutti i pazienti facenti parte dello stesso cluster, abbiamo effettuato anche un'analisi univariata per verificare l'esistenza di differenze statisticamente significative tra i due gruppi nelle concentrazioni dei metaboliti individuati. Come anticipato nella sezione dei Risultati, le concentrazioni di betaina (N,N,N-trimetilglicina) e DMG sono risultate essere statisticamente più elevate nel gruppo di pazienti con patologia del microcircolo rispetto a quelli con CAD stenotica mentre, nel confronto diretto tra coronarie affette e non affette da stenosi, ha dimostrato differenze statisticamente significative la sola betaina, con livelli ematici circa 3.4 volte minori nelle coronarie stenotiche rispetto a quella angiograficamente normali ($0.4196 \mu\text{M}$ vs $0.1228 \mu\text{M}$).

La betaina agisce come donatore di gruppi metilici in varie reazioni fisiologiche, come nel ciclo della metionina, nel quale converte l'omocisteina in metionina stessa, e nella sintesi della creatina[148].

Negli anni 50 del secolo scorso, vari lavori hanno teorizzato un possibile ruolo della supplementazione di betaina e guanidinoacetato nel determinare un miglioramento della performance cardiaca in pazienti affetti da scompenso cardiaco e nel migliorare la resistenza alla fatica in soggetti con patologie croniche[149]. Tale effetto sarebbe dovuto all'aumentata sintesi di creatina della quale la betaina ed il guanidinoacetato sono precursori, indotta dall'aumentata disponibilità dei substrati; tuttavia questa ipotesi non ha trovato seguito negli anni successivi.

Allo stesso modo, nelle ultime decadi, vari lavori hanno alternativamente sostenuto[150] o negato[151,152] gli effetti protettivi della betaina nei confronti della patologia aterosclerotica.

Tale azione è stata imputata fondamentalmente a 3 possibili effetti della betaina: 1) l'azione catabolica nei confronti dell'omocisteina; 2) la riduzione dello stress ossidativo sia a livello endoteliale che a carico delle LDL; 3) le proprietà antinfiammatorie.

L'azione di riduzione dei livelli di omocisteina è dovuta al ciclo della metionina, nell'ambito del quale la betaina cede un gruppo metilico, trasformandosi in DMG, all'omocisteina, che viene convertita, appunto, in metionina[148]. Secondo alcuni studi il rischio cardiovascolare, in soggetti sani, aumenta di almeno 3 volte quando presentano elevati valori di omocisteina circolante[153]. Sulla base di queste osservazioni l'iperomocisteinemia viene considerata un fattore indipendente di rischio aterosclerotico ed aterotrombotico. Tuttavia non è ancora chiaro quali livelli di omocisteinemia considerare come cut-off di riferimento nel determinismo del rischio di eventi cardiovascolari. Le concentrazioni sieriche limite, considerate da molti, sono circa 11,4 $\mu\text{mol/l}$ per gli uomini e 10,4 $\mu\text{mol/l}$ per le donne. La relazione fra iperomocisteinemia e rischio cardiovascolare diviene manifesta per valori di omocisteina superiori a 15 $\mu\text{mol/litro}$ e aumenta gradualmente.

Sono stati descritti meccanismi patogenetici come fenomeni di downregulation della trombomodulina e upregulation del fattore tissutale in sede endoteliale e macrofagica[151,152]. Inoltre l'iperomocisteinemia è associata ad un'importante compromissione della FMD. Sembra essere presente, in queste condizioni, una maggiore inattivazione di tipo ossidativo di NO da parte dei ROS che si sono originati dall'auto-ossidazione dell'omocisteina e/o accumulati come conseguenza dell'inattivazione mediata proprio dall'omocisteina degli enzimi antiossidanti o da una maggiore sintesi endoteliale di inibitori endogeni di NO sintetasi.

Nonostante tali basi, vari lavori hanno valutato la possibilità di utilizzare supplementi di betaina per ridurre i valori di omocisteina e/o migliorare la funzione endoteliale, sia in soggetti sani che

patologici, senza riuscire a dimostrare effetti positivi sulla funzione endoteliale nonostante la riduzione dei livelli di omocisteina.[154]

Al contrario, esistono in letteratura evidenze crescenti relative alla capacità della betaina di proteggere l'organismo dallo stress ossidativo,[155] di determinare un assetto lipidico “anti-aterogeno”[156] e di inibire i processi infiammatori implicati nell'aterogenesi[157].

I nostri dati, sebbene preliminari, sembrerebbero suggerire un ruolo protettivo esercitato dai livelli di betaina fisiologicamente determinati (nessuno dei pazienti arruolati assumeva supplementi dietetici), che probabilmente si esplica attraverso una azione sinergica di tutti gli effetti “putativi” sopra elencati. L'evidenza di valori significativamente diversi non solo tra pazienti con diverse manifestazioni di malattia coronarica ma anche, nello stesso paziente, tra coronarie con diversi gradi di malattia farebbe ipotizzare un'azione locale della betaina, attraverso i meccanismi già descritti.

La DMG, anch'essa presente in concentrazione significativamente maggiore nel Gruppo B rispetto a quello A, sembrerebbe rivestire un ruolo di semplice marcatore, piuttosto che di effettore, correlato alla betaina in quanto suo prodotto di demetilazione; in letteratura, infatti, non esistono dati a supporto di un ruolo attivo di questo composto nel determinare modificazioni della funzione endoteliale o del profilo di rischio dei pazienti affetti da patologia cardiovascolare. Tale supposizione sembra confermata dall'assenza di differenze significative nel confronto diretto tra coronarie stenotiche rispetto a quelle prive di lesioni.

La fisiopatologia della malattia aterosclerotica è ancora lontana dall'essere pienamente compresa. I classici fattori di rischio clinici hanno sicuramente un fondamentale ruolo diagnostico e prognostico ma, da soli, non sono in grado di spiegare la complessità dei meccanismi che, dalla presenza dei fattori di rischio stessi, portano alla manifestazione anatomopatologica della malattia; è esperienza

comune imbattersi in pazienti portatori di multipli fattori di rischio ma privi di lesioni ateromatose o, nel caso speculare, di individui con coronaropatia in totale assenza di fattori di rischio. I mediatori biochimici, consentono di aumentare la sensibilità del nostro approccio allo studio della malattia aterosclerotica ma, come dimostrato dalla mancanza di dati univoci, anch'essi, almeno se considerati singolarmente, non sono in grado di spiegare interamente l'intero processo eziopatogenetico. La betaina sembrerebbe essere un biomarker più sensibile e specifico dello stato di funzione endoteliale e potrebbe, in futuro, essere utilizzato a scopi prognostici o, addirittura, terapeutici.

Inoltre, la metabolomica sembrerebbe confermarsi uno strumento utile ed idoneo allo studio delle basi fisiopatologiche della cardiopatia ischemica, consentendo non solo di accrescere la nostra comprensione della storia naturale della malattia stessa ma anche di individuare nuovi tool diagnostici e target terapeutici innovativi, in grado di modulare la risposta endoteliale e modificare l'evoluzione della coronaropatia.

**RELAZIONE TRA RESISTENZE VASCOLARI POLMONARI E PROFILO METABOLOMICO DA PRELIEVO
IN SITU
IN PAZIENTI AFFETTI DA SCLEROSI SISTEMICA**

Introduzione

La Sclerosi Sistemica (SSc), o sclerodermia, è una patologia autoimmune multisistemica cronica, caratterizzata da un'eccessiva deposizione di collagene e di componenti della matrice interstiziale a livello del derma e degli organi interni, e da un interessamento del microcircolo e delle arteriole muscolari con vasculopatia obliterante e proliferativa[158]. La prevalenza riportata è tra i 150-300 casi per 1000000 abitanti con notevoli variazioni a seconda delle regioni geografiche: essa è più alta in Nord America, Europa ed Australia rispetto a Giappone, Regno Unito, Taiwan e India[158]. In Europa la prevalenza è maggiore negli stati del sud (Grecia, Francia) rispetto a quelli del nord (Inghilterra, Islanda).

Nell'ambito della SSc si possono identificare diversi subset clinici[159,160]:

Forma cutanea diffusa (dSSc) Sviluppo rapido e simmetrico di fibrosi a carico degli arti, del volto e del tronco; breve intervallo di tempo che intercorre tra l'esordio del fenomeno di Raynaud e l'insorgenza della sclerosi cutanea. Questa forma è gravata da un'elevata frequenza di interessamento viscerale, precoce e ingravescente, motivo per cui la prognosi è severa.

Forma cutanea limitata (lSSc) Si presenta come un ispessimento cutaneo, simmetrico, limitato al volto e alle estremità distali degli arti. In questo caso può intercorrere un lungo periodo di tempo, anche decenni, tra l'esordio della malattia (ad es. fenomeno di Raynaud) e l'espressione delle tipiche manifestazioni viscerali. Questa forma presenta frequentemente le caratteristiche della sindrome Calcinosi, Raynaud, Esofagopatia, Sclerodattilia e Teleangectasie (sindrome CREST).

L'interessamento viscerale è meno frequente e più tardivo rispetto alla forma diffusa, ed ha perciò una prognosi più favorevole, eccetto in quei pazienti che, dopo molti anni, sviluppano ipertensione polmonare, isolata o in presenza di fibrosi.

Forma cutanea intermedia La sclerosi cutanea interessa gli arti in toto, ma risparmia il tronco. L'evoluzione clinica e la prognosi sono intermedie tra le altre due forme.

Si parla di Sindromi overlap quando il quadro di SSc si associa ad altre connettiviti, come la sindrome di Sjogren, la polimiosite e il lupus eritematoso sistemico, o a patologie reumatologiche come l'artrite reumatoide[161].

Il decorso della SSc è piuttosto variabile.

La sclerosi cutanea limitata ha una prognosi più favorevole, ad eccezione dei casi che si associano a sviluppo di ipertensione polmonare[158,162,163]. In alcuni pazienti con malattia cutanea limitata, il malassorbimento intestinale e la cirrosi biliare primitiva sono cause di morbidità e mortalità.

La prognosi è generalmente peggiore nei pazienti con sclerosi sistemica diffusa, in particolare nei pazienti maschi e quando l'esordio della malattia è tardivo.

Nei pazienti con SSc cutanea diffusa l'indice di sopravvivenza cumulativa è di circa il 70% a 5 anni e del 55% a 10 anni, mentre in caso di SSc cutanea limitata è rispettivamente del 90% e 75% circa[164]. La sopravvivenza è notevolmente aumentata dopo l'introduzione di trattamenti efficaci per il coinvolgimento viscerale.

Le complicanze polmonari, sono la causa di morte più importante in corso di SSc, con una mortalità a dieci anni dalla diagnosi del 40%[165].

Il coinvolgimento cardiaco, insieme a quello polmonare, è una delle più frequenti complicanze in grado di influenzare la prognosi complessiva della SSc[166], con un tasso di prevalenza all'esame autoptico intorno all'80% dei casi[167]. Esso può essere primitivo o secondario al coinvolgimento

di altri organi e può evolvere indipendentemente dalle tipiche complicanze della sclerosi sistemica[168]. Può presentarsi come patologia miocardica, alterazioni del sistema di conduzione, alterazioni delle coronarie, aritmie e patologie del pericardio[169]. Da un punto di vista anatomo-patologico le lesioni predominanti sono caratterizzate da zone di fibrosi miocardica (50-80% dei casi), che si evidenziano a carico di entrambe i ventricoli, con deposito di collagene nelle aree di necrosi dei miociti; tale quadro, definito a “bande di contrazione”, indica la presenza di alterazioni del microcircolo o “fenomeno di Raynaud cardiaco” [170].

L'ipertensione polmonare nella sclerosi sistemica

L'ipertensione polmonare (IP) rappresenta un'importante causa di mortalità nella SSc e insorge in corso di tale patologia in una percentuale dell'8-12%[171].

La presentazione clinica dell'IP lieve-moderata è relativamente aspecifica e simile a quella dell'interstiziopatia che, in questo tipo di pazienti, si presenta con dispnea da sforzo e astenia. Per tale motivo, spesso viene riconosciuta solo nelle fasi tardive della patologia, quando si manifestano i sintomi dello scompenso cardiaco destro.

L'IP nella sclerosi sistemica (SSc-PAH) presenta una sopravvivenza ad 1 anno pari al 50%, comparata alla sopravvivenza del 90% per i pazienti con interstiziopatia senza ipertensione arteriosa polmonare o senza coinvolgimento di altri organi[172]. Risulta da numerosi studi che la SSc-PAH ha sicuramente una prognosi peggiore rispetto all'ipertensione polmonare idiopatica (iPAH) [158,173].

L'avvento di nuovi farmaci per l'ipertensione polmonare ha permesso un miglioramento della sopravvivenza quando confrontata con i controlli storici.

E' dimostrato che un precoce riconoscimento con precoce trattamento è associato ad un outcome migliore, e che il rischio di morte aumenta di circa l'11% per ogni 10 mmHg di incremento della PAP media alla diagnosi[174].

La SSc-PAH spesso è isolata e meno comunemente è secondaria all'interstiziopatia polmonare che si presenta in questi pazienti; non infrequente è la loro associazione, sebbene il più importante predittore di mortalità in questa categoria di pazienti sia comunque la presenza di IP[175].

Un'ulteriore causa di IP secondaria può essere l'aumento delle pressioni venose polmonari in seguito alla disfunzione sistole-diastolica presente nel cuore sclerodermico.

La forma primitiva della SSc-PAH ha una patogenesi simile a quella idiopatica[176].

La disfunzione endoteliale induce l'attivazione dei miofibroblasti, cui segue la produzione di potenti agenti vasocostrittori endoteliali e la riduzione della produzione di agenti vasodilatatori come l'ossido nitrico (NO) e le prostacicline; questi eventi contribuiscono alla proliferazione delle cellule muscolari lisce, all'ipertrofia, all'infiammazione e alla fibrosi dell'avventizia nelle arterie di medio e piccolo calibro[177].

Un aumento dell'espressione dell'endotelina (ET) nei pazienti con fenomeno di Raynaud e coinvolgimento cutaneo e polmonare indica un ruolo determinante di questa citochina nella patogenesi della sclerosi sistemica[178].

Quindi sia la vasocostrizione sia i fenomeni che causano rimodellamento vasale determinano l'incremento delle resistenze vascolari polmonari.

Materiali e Metodo

Popolazione studiata

Sono stati arruolati 18 pazienti di entrambi i sessi (età media $58,72 \pm 15,61$ anni; range 36-70 anni) con diagnosi di SSc provenienti dall'Ambulatorio di Immunologia clinica del nostro P.O.

Sono stati adottati i seguenti criteri di inclusione: a. età compresa fra 30 e 80 anni; b. frazione di eiezione $>50\%$ (metodo di Simpson biplano) e assenza di alterazioni della cinetica del ventricolo sinistro a riposo; c. diagnosi di SSC da almeno un anno.

Sono stati esclusi gli individui: a. affetti da cardiopatia ischemica o d'altra origine in atto o pregressa; b. ipertesi con ipertrofia ventricolare sinistra (negatività ECG ed eco 2D); c. portatori di pace-maker cardiaco; d. affetti da fibrillazione atriale o altre aritmie maggiori; e. gravi inabilità che non consentono la deambulazione.

Il 38% dei pazienti ($n=7$) è risultato affetto da ipertensione arteriosa, il 100% dei quali in trattamento farmacologico; l'11% ($n=2$) da dislipidemia; nessuno era affetto da diabete mellito di tipo I o II; il 16% ($n=3$) dei pazienti era fumatore ed il 22% ($n=4$) ex-fumatore.

Le caratteristiche antropometriche, i dati relativi allo stato di malattia ed alla terapia in corso sono riassunti nella Tabella 7.

Al fine di valutare la presenza di eventuali differenze nel profilo metabolico locale indicative di possibili alterazioni della funzione endoteliale, abbiamo suddiviso la popolazione in due gruppi, utilizzando come cut-off il limite superiore del range di normalità delle resistenze vascolari polmonari (PVR)[179]: Gruppo 1 con $PVR < 1.6$ uW e Gruppo 2 con $PVR > 1.6$ uW.

Tabella 7. Dati antropometrici e clinici dei pazienti arruolati

	Popolazione totale	Gruppo 1	Gruppo 2
Età (anni)	58.72 ± 15.61	61.50 ± 7.21	56.50 ± 9.94
Altezza (mt)	1.57 ± 0.36	1.61 ± 0.06	1.54 ± 0.07
Peso (Kg)	65.22 ± 18.42	69.13 ± 12.79	62.10 ± 10.82
BSA (m ²)	1.66 ± 0.40	1.74 ± 0.19	1.60 ± 0.14
BMI (Kg/ m ²)	26.41 ± 7.15	26.49 ± 3.41	26.35 ± 5.03
Anni di malattia	6.57 ± 3.86	5.50 ± 3.51	7.38 ± 4.14
Bosentan (n)	8	4	4
Sildenafil (n)	4	0	4
Iloprost (n)	17	7	10

Protocollo di studio

Tutti i soggetti arruolati sono stati informati sulle finalità e la metodologia dello studio ed hanno espresso il proprio consenso in forma scritta prima della loro inclusione.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a:

- ✓ visita clinica, ECG a 12 derivazioni, ecocardiogramma color Doppler secondo le raccomandazioni delle linee guida delle società scientifiche di settore;
- ✓ cateterismo cardiaco destro con misurazione dei parametri emodinamici e prelievo ematico a catetere incuneato per l'analisi metabolomica.

Analisi metabolomica

I campioni ematici sono stati ottenuti durante il cateterismo cardiaco destro, a catetere incuneato, e raccolti in una provetta eparinata da 10 ml, immediatamente sottoposta a centrifugazione a 4000 rpm per 15 minuti; il surnatante è stato quindi aliquotato in cuvette da 800 µL e conservato a – 80 °C. Al momento dell'analisi ¹H-NMR, i campioni sono stati scongelati e centrifugati a 4500 rpm per 10 minuti a 4°C; 400 µl di surnatante sono stati prelevati e addizionati di una soluzione standard (150 µL di acqua deuterata [D₂O] e 100 µL di acido Dimetil-Silil-Sulfonico [DSS] 50 mM). In questo caso non è stata eseguita l'estrazione in cloroformio/metanolo, mentre il resto delle procedure di analisi è stato lo stesso descritto in precedenza.

Risultati

Ecocardiografia

I dati ecocardiografici hanno evidenziato normali dimensioni del ventricolo sinistro e parametri di funzione sistolica nella norma, senza differenze tra i due gruppi.

La funzione diastolica, valutata sia mediante il pattern di flusso transmitralico (velocità delle onde E ed A e loro rapporto) che sulla base dei dati ottenuti con metodica TDI (IVRT, velocità onde E' ed A', E/E'), non è risultata compromessa in modo significativo in nessuno dei pazienti; dal confronto tra i due gruppi non sono emerse differenze statisticamente significative in nessuno dei parametri valutati.

Tali dati e quelli relativi alla funzione diastolica sono riportati nella Tabella 3.

Per quanto riguarda le dimensioni e la funzione delle sezioni destre, tutti i pazienti hanno presentato valori nel range di normalità.

La stima delle PAPs, effettuata secondo quanto previsto nelle Linee guida ESC relative all'ipertensione polmonare[180], non ha evidenziato valori patologici nè differenze statisticamente significative nei 2 gruppi.

Tali dati, nel loro complesso, individuano una popolazione di soggetti in buon compenso emodinamico, privi di segni clinici o strumentali di compromissione significativa della funzione cardiaca.

Cateterismo cardiaco destro

La procedura è stata ben tollerata da tutti i pazienti e priva di complicanze.

Otto pazienti hanno mostrato PVR nell'ambito del range di normalità (Gruppo 1) mentre i restanti presentavano valori patologici (Gruppo 2; $p < 0.001$. Figura 11).

Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative nei 2 gruppi tra i parametri valutati eccetto che per il TPG, risultato significativamente più alto nei pazienti con PVR maggiori.

I valori medi di PAP sono risultati nella norma nel Gruppo 1 (20 ± 4 mmHg) e indicativi di IP nel Gruppo 2 (25 ± 5 mmHg, $p = 0.06$).

I valori di PCWP, Cardiac Output e Cardiac Index non hanno mostrato differenze statisticamente significative nei due gruppi ed hanno confermato l'assenza di compromissione funzionale delle sezioni destre e sinistre del cuore, con valori nel range di normalità per tutti i pazienti (Tabella 8).

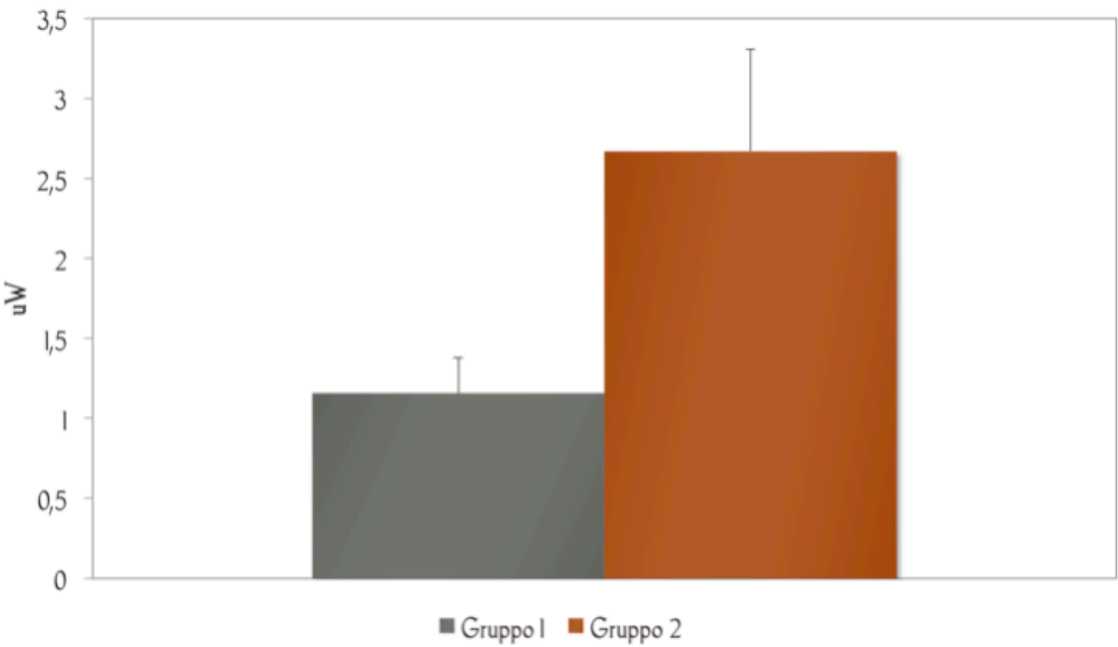
Tabella 8. Dati cateterismo cardiaco destro nella popolazione completa e nei due gruppi

	Popolazione totale	Gruppo 1	Gruppo 2
PVR (uW)	$2,0 \pm 0,98$	$1,16 \pm 0,23$	$2,67 \pm 0,67^*$
PAP media (mmHg)	23 ± 7	20 ± 4	25 ± 5
PCWP (mmHg)	13 ± 5	13 ± 3	12 ± 5
TPG (mmHg)	10 ± 4	7 ± 2	$13 \pm 3^*$
CO (ml)	$5,26 \pm 1,83$	$5,56 \pm 1,51$	$5,01 \pm 1,49$
CI (l/min)	$3,26 \pm 1,07$	$3,20 \pm 0,61$	$3,31 \pm 1,00$

PVR: Pulmonary Vascular Resistance; PAP: Pressione Arteria Polmonare; PCWP: Pulmonary Capillary Wedge Pressure; TPG: Transpulmonary Pressure Gradient; CO: Cardiac Output; CI: Cardiac Index.

* $p < 0.001$ vs Gruppo 1

Figura 11. Valori di PVR nei due gruppi di pazienti



Analisi Metabolomica

L'applicazione di una PCA non ha permesso di identificare alcuna separazione spontanea tra i soggetti studiati considerati come un unico pool di dati, mentre la PLS-DA ha evidenziato una parziale clusterizzazione pur senza raggiungere la significatività statistica.

Successivamente abbiamo effettuato un filtraggio della matrice dei dati metabolici (Orthogonal Signal Correction, OSC) utilizzando come variabile Y i valori di PVR. La matrice ottenuta in tal modo è stata sottoposta ad una nuova PCA, generando una separazione dei dati nelle due classi identificate a priori; una più netta separazione è stata evidenziata applicando al modello una PLS-DA, con buoni valori di R^2 ($R^2X = 0.364$; $R^2Y = 0.889$) e di Q^2 (0.721) e con un valore di p statisticamente significativo (0.0029) alla cross-validation effettuata mediante ANOVA (Figura 12). Tale modello, che, come anticipato, è stato costruito utilizzando i dati ricavati dagli spettri $^1\text{H-NRM}$ come matrice dei dati X ed i valori delle PVR come variabile Y, è espressione della co-varianza di un insieme discreto di molecole, piuttosto che delle variazioni delle stesse molecole considerate singolarmente; in altre parole, ciò che determina la discriminazione dei gruppi è il modificarsi di un certo numero di variabili con le stesse modalità.

L'analisi delle VIP ha consentito di identificare una serie di metaboliti particolarmente importanti nel determinare la separazione nei 2 gruppi; a tal fine è stato utilizzato uno score maggiore di 1 come limite di significatività[58]. L'importanza di tali variabili è stata confermata anche dall'analisi dei Contribution plot, un tool del software SIMCA-P13+ (Umetrics Academy) che consente di determinare il contributo di ciascuna variabile nel definire i gruppi identificati. Tale analisi ha anche permesso di stabilire la “direzione” (aumento o diminuzione) nella concentrazione di ciascun metabolita associata alla clusterizzazione di un soggetto in un determinato gruppo. Nello specifico, i metaboliti identificati e la relativa variazione sono presentati nella Tabella 9.

Figura 12. Scatterplot della PLS-DA effettuata dopo OSC

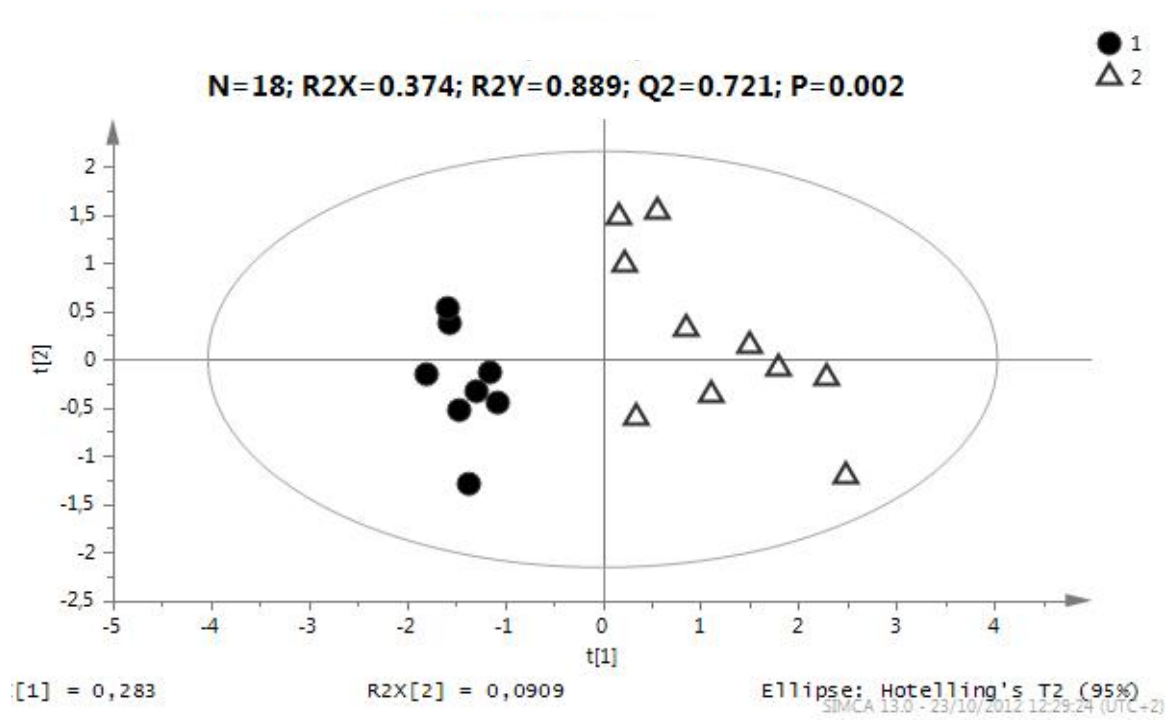


Tabella 9. Metaboliti identificati con l'analisi delle VIP

Metaboliti	Gruppo 1 (PVR<1.6 uW)	Gruppo 2 (PVR>1.6 uW)
Lattato	-	+
VLDL/LDL	-	+
Glicerolo/Glicerato	-	+
Acidi grassi	-	+
Valina, Leucina, Isoleucina	-	+
Acetoacetato	-	+
Alanina	+	-
Betaina	+	-
Colina	+	-
Creatina/Creatinina	+	-
TMA	+	-
Taurina	+	-
Arginina	+	-
3-Idrossibutirrato	+	-
Glicina	+	-

Discussione

La SSc-PAH ha una prognosi peggiore rispetto alla forma primitiva, con una mortalità del 50% ad 1 anno rispetto al 10% dei pazienti con interstiziopatia senza PAH[172]. Le cause che conducono all'aumento delle PVR in assenza di fenomeni fibrotici a carico del parenchima polmonare non sono completamente note. E' verosimile che un ruolo fondamentale sia svolto dalla disfunzione endoteliale, attraverso l'attivazione dei miofibroblasti, cui consegue uno sbilanciamento a favore della produzione di agenti vasocostrittori rispetto a quelli vasodilatatori. Questi eventi contribuiscono alla proliferazione delle cellule muscolari lisce, all'ipertrofia, all'infiammazione e alla fibrosi dell'avventizia nelle arterie di medio e piccolo calibro[177].

Il presente studio ha preso le mosse da queste teoriche premesse e ha inteso offrire un contributo originale per mezzo di una tecnica innovativa, l'analisi metabolomica. Con tale nuova metodica è stato esaminato il sangue prelevato dall'arteria polmonare di pazienti portatori di SSc, al fine di verificare se fosse possibile identificare differenze tra i pazienti che presentavano PRV nel range di normalità e quelli che, invece, denunciavano PVR aumentate.

I dati clinici, antropometrici, ecocardiografici ed emodinamici, derivati dal cateterismo cardiaco destro, hanno confermato in tutti i pazienti l'assenza di compromissione della funzione destra e sinistra del cuore e la confrontabilità dei due gruppi, che sono risultati differenti solo per i parametri relativi alle PVR.

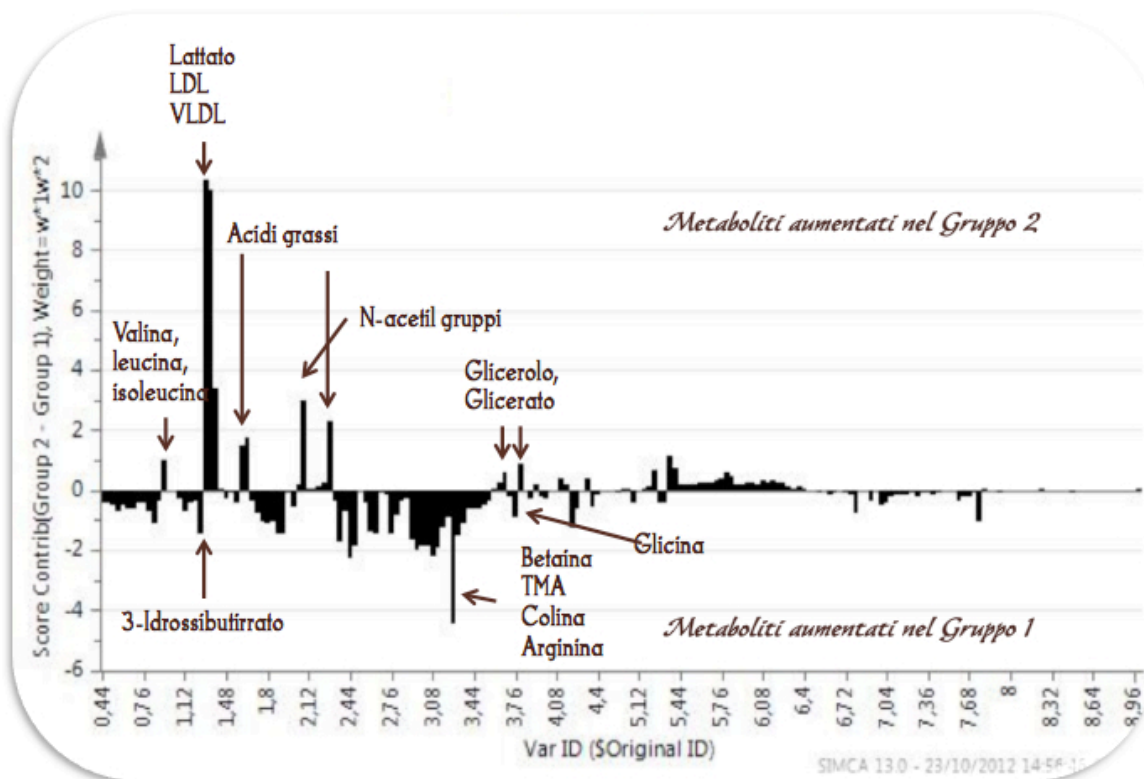
La metabolomica, nella nostra ipotesi di lavoro e sulla base delle conoscenze sin qui accumulate, sembrava rappresentare lo strumento idoneo ad identificare eventuali alterazioni dello stato metabolico, a loro volta in grado di spiegare la differente evoluzione di una patologia per altri versi comparabile nei due gruppi[59,60].

Al fine di isolare i metaboliti potenzialmente correlati a diversi gradi di disfunzione endoteliale, abbiamo applicato alla matrice dei dati originata dall'analisi di spettroscopia $^1\text{H-NMR}$ una Orthogonal Signal Correction (OSC), metodica che consente di filtrare i dati eliminando quelli che non co-variano con il parametro utilizzato come variabile Y. Nel caso specifico del nostro studio, abbiamo utilizzato i valori di PVR misurati durante il cateterismo cardiaco destro. L'applicazione di questa tecnica ha permesso di evidenziare una separazione tra i due gruppi già in ambito di analisi non supervisionata (PCA). La clusterizzazione è divenuta anche più evidente con l'utilizzo di una metodica supervisionata come la PLS-DA (Figura 12).

La PLS-DA è stata recentemente applicata allo studio di pazienti con episodi di edema polmonare prodotti dalla presenza in alta quota (EPAQ) [181]. In quello studio, Luo e coll. hanno analizzato mediante $^1\text{H-NMR}$ il plasma di 10 pazienti e lo hanno confrontato con quello di 10 controlli, evidenziando differenze significative nelle concentrazioni dei seguenti metaboliti: valina, lisina, leucina, isoleucina, glicerol-fosforil-colina, glicina, glutamina, glutamato, creatinina, citrato e metil-istidina, risultati aumentati, nonché α - e β -glucosio, trimetilamina, e alcuni prodotti del metabolismo lipidico, risultati ridotti.

Molti di questi metaboliti sono stati identificati anche nel nostro studio con l'analisi dei Loadings e dei Contribution Plots (Figura 13). Nel dettaglio, nel Gruppo 1 sono risultati aumentati, rispetto al gruppo 2: betaina, colina, TMA, arginina, 3-OH-butirrato, glicina, creatina e taurina, e ridotti lattato, VLDL/LDL, glicerolo/glicerato, gli aminoacidi a catena ramificata (BCAA, valina, leucina, isoleucina) e alcuni acidi grassi

Figura 13. Contribution Plot relativo alla PLS-Da



Allo stato della nostra conoscenza non ci è possibile identificare, per tutti e per ciascuno di questi metaboliti, una specifica funzione biologica in grado di spiegarne il ruolo nella differente estrinsecazione della patologia SSc. Ciò non di meno, è estremamente interessante osservare che, per la gran parte dei metaboliti risultati aumentati nel Gruppo 1, sono descritte in letteratura evidenze relative ad una loro capacità di protezione della funzione endoteliale, attuata particolarmente in relazione alla produzione di NO.

Una particolare attenzione va riservata all'aumento di betaina e di colina, suo precursore. Sono questi elementi essenziali della via metabolica che trasforma l'omocisteina in metionina, attraverso una reazione di metilazione nell'ambito della quale la betaina funge da donatore di gruppi metilici[148]. Nelle ultime decadi, diversi studi condotti sull'argomento hanno, rispettivamente, sostenuto[150,151,182-185] o negato[152,186] gli effetti protettivi della betaina nei confronti della patologia aterosclerotica e della disfunzione endoteliale.

L'azione della betaina è stata imputata fondamentalmente a 3 possibili suoi effetti: 1) l'azione catabolica nei confronti dell'omocisteina; 2) la riduzione dello stress ossidativo; 3) la modulazione della risposta infiammatoria.

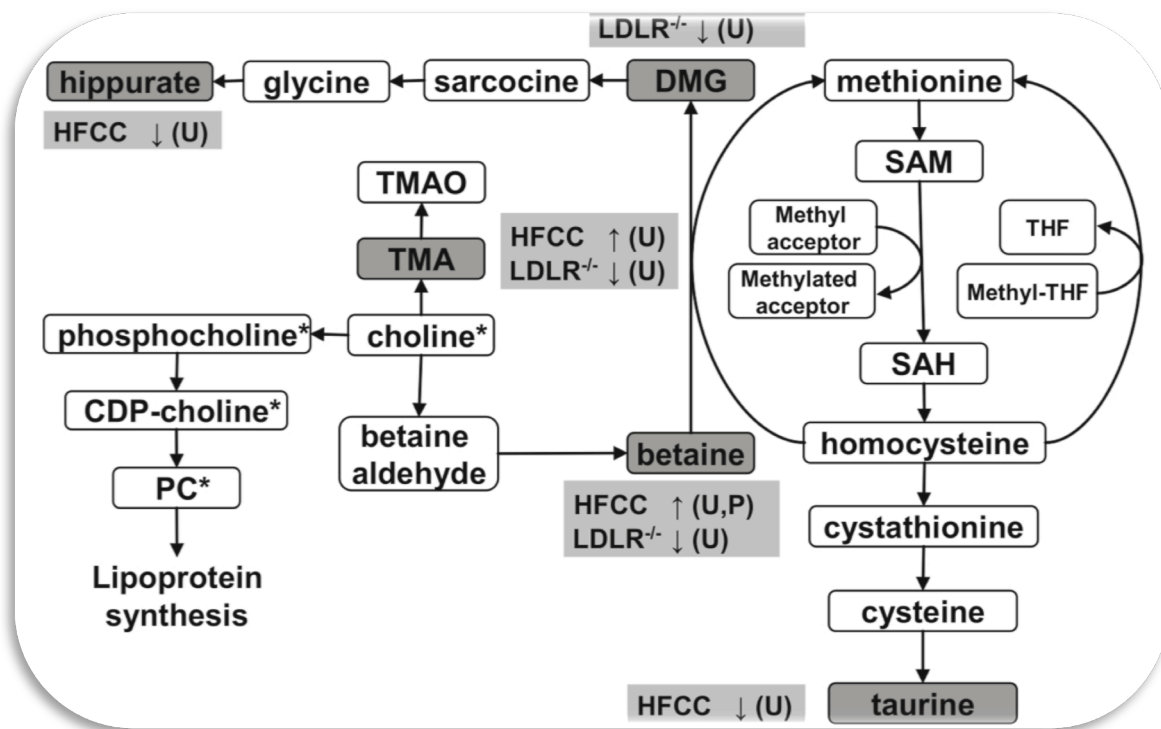
Sono stati ipotizzati vari meccanismi patogenetici come la downregulation della trombomodulina e l'upregulation del fattore tissutale in sede endoteliale e macrofagica[187-189]. L'iperomocisteinemia è associata ad una compromissione della Flow-Mediated Dilation, ascrivibile a maggiore inattivazione ossidativa dell'NO da parte dei ROS, originati dall'auto-ossidazione dell'omocisteina e/o accumulati in conseguenza dell'inattivazione omocisteina-mediata degli enzimi antiossidanti, o da una maggiore sintesi endoteliale di inibitori della NO sintetasi.

Alcuni trial, che hanno utilizzato supplementi di betaina per ridurre i valori di omocisteina e migliorare la funzione endoteliale, in soggetti sani e patologici, non hanno evidenziato effetti endoteliali positivi, nonostante la riduzione dell'omocisteinemia [152,154]. Al contrario, evidenze crescenti della letteratura segnalano la capacità della betaina di proteggere l'organismo dallo stress ossidativo[190] e di inibire i processi infiammatori implicati nell'aterogenesi[157,183].

Meccanismi simili sono stati dimostrati anche per altri metaboliti tra quelli individuati come discriminanti i due gruppi. Creatina, arginina, glicina e taurina hanno dimostrato il loro effetto protettivo dell'endotelio, agendo sia come modulatori del metabolismo dell'NO che come radical scavenger. Inoltre, arginina, glicina e taurina sono prodotti nello stesso ciclo che vede coinvolte colina e betaina e che porta al catabolismo dell'omocisteina[191] (Figura 14).

La creatina sembrerebbe avere un effetto antinfiammatorio a livello endoteliale, inibendo l'espressione di ICAM-1 e di E-Selectina[192], così riducendo la marginazione dei neutrofili. Inoltre, la creatina sarebbe in grado di ridurre la permeabilità dell'endotelio [192]. Sestili e collaboratori ne hanno evidenziato un effetto citoprotettivo, mediato dall'azione di radical scavenger nei confronti dei ROS e del perossinitrito[193].

Figura 14. Metabolismo della colina e della betaina.



Altri studi hanno dimostrato la capacità dell'arginina di preservare la funzione endoteliale attivando la produzione di NO; Watts et al hanno dimostrato l'importanza della deplezione di questo metabolita nella vasocostrizione del circolo polmonare che si verifica in seguito a tromboembolismo venoso[194]. Il gruppo di Luicking, in un recente lavoro, ha valutato il ruolo dell'arginina in stati patologici, suggerendo l'importanza di mantenerne livelli ematici adeguati al fine di preservare una corretta produzione di NO e, nel contempo, ridurre la formazione di anione superossido e stress ossidativo a livello endoteliale[195].

Anche la glicina possiede proprietà antinfiammatorie, dimostrate a livello delle arterie coronarie umane. Tali effetti sono condivisi dall'istidina e dalla cisteina e sembrerebbero mediati dall'inibizione dell'espressione del fattore nucleare kB (NF-KB), implicato nell'eziopatogenesi delle vasculiti e dell'aterosclerosi, del CD62E e della produzione di interleuchina 6[196]. D'altra parte, Mc Carty et al hanno sostenuto il ruolo antiaterogeno dell'iperpolarizzazione delle cellule endoteliali indotta dall'attivazione dei canali per il cloro glicina-dipendenti[197].

La taurina, un aminoacido semi-essenziale, è un antiossidante con effetti antinfiammatori dovuti all'inibizione delle interleuchine 1 e 6. Essa è pure in grado di ridurre l'espressione del TGF- β , citochina implicata nella fibrosi e con un ruolo patogenetico particolarmente rilevante nella SSc[198]. D'altra parte, già nel 1996, Wang aveva sostenuto un ruolo protettivo della taurina nei confronti del danno polmonare acuto in corso di sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS), sostenendo una possibile funzione antiapoptotica a livello delle cellule endoteliali mediata dagli effetti antiossidanti e di modulazione della concentrazione intracitoplasmatica di Ca^{2+} [199]. Ancora, Tan e collaboratori hanno evidenziato la capacità della taurina di ridurre i livelli di ADMA, un inibitore endogeno della produzione di NO, preservando in tal modo la funzione endoteliale[200].

Al contrario dei metaboliti fin qui descritti, per i quali le evidenze presenti in letteratura consentono di ipotizzare uno specifico ruolo nell'ambito della funzione/disfunzione endoteliale, per i restanti appare più difficile stabilire un preciso inquadramento di tipo fisiopatologico,

Le VLDL/LDL, che sono relativamente più elevate nel Gruppo 2, potrebbero non avere un ruolo diretto, ma rappresentare semplicemente la risultante di un diverso assetto metabolico che, determinando l'utilizzo della colina prevalentemente nella via metabolica che porta alla formazione della fosfatidilcolina, necessaria a livello epatico per l'assemblamento delle VLDL[201,202], ne riduce la concentrazione e quindi la possibile conversione in betaina[184], rendendo meno attive le vie che poi portano alla formazione di molti dei metaboliti dei quali si è già trattato[201].

Per i corpi chetonici β -idrossibutirrato ed acetoacetato, aumentati rispettivamente nel Gruppo 1 e nel 2, esistono scarsi dati in letteratura per quanto riguarda un possibile ruolo nell'IP; tuttavia, uno studio ne evidenzia effetti opposti sulla secrezione di Endotelina-1 (ET-1) in cellule endoteliali di topo. Lo studio ha messo in evidenza come entrambi determinerebbero un aumento nella produzione di VEGF, mentre il solo acetoacetato (nel nostro studio relativamente aumentato nei pazienti con PVR elevate) sarebbe in grado di stimolare la produzione di ET-1[203].

I BCAA possono indurre, se presenti in concentrazione elevate come avviene nei difetti congeniti del loro metabolismo o in caso di eccessiva introduzione con l'alimentazione, un danno ossidativo dimostrato soprattutto a livello gliale e neuronale[204,205]. Ma non esistono evidenze che tale effetto possa manifestarsi anche a livello endoteliale e a concentrazioni plasmatiche normali.

Per gli altri metaboliti individuati, sebbene importanti ai fini della clusterizzazione, non sono presenti dati in letteratura che possano chiarirne il possibile ruolo nel determinare una diversa evoluzione della SSc, quantomeno nella sua estrinsecazione a carico del circolo polmonare. Questo può essere dovuto sia alla mancanza di studi orientati in tal senso, sia alla identificazione effettuata, al momento, solo sulla base delle zone dello spettro $^1\text{H-NMR}$, che, in taluni bucket, consente solo

di individuare la classe di composti ma non il singolo metabolita. Questo limite, intrinseco alla metodica di analisi utilizzata, sarà superato, nel prosieguo dello studio, grazie all'utilizzo della spettrometria di massa in fase gassosa (GC-MS) che consentirà non solo la corretta identificazione di ciascun metabolita, ma anche il suo preciso dosaggio.

Conclusioni

Visti nel complesso, i risultati presentati suggeriscono l'applicabilità dell'approccio metabolomico allo studio delle patologie CV; in particolare, ne mostrano la capacità di identificare le alterazioni biochimiche che sottendono le manifestazioni clinico-strumentali delle patologie studiate, in buona parte dei casi con sensibilità maggiore rispetto ai parametri comunemente utilizzati nella pratica clinica.

Tale capacità sembra in grado di aumentare la nostra conoscenza della fisiopatologia cardiovascolare, consentendo di comprenderne meglio le manifestazioni e l'evoluzione e, quindi, di ipotizzare nuove applicazioni diagnostiche, più sensibili, specifiche e rapide di quelle attualmente utilizzate, nonché di individuare pathways che possano divenire target per nuovi approcci terapeutici.

Tali caratteristiche sembrerebbero permettere di avviare un percorso che possa, nel medio-lungo periodo, condurre effettivamente alla realizzazione compiuta di un approccio realmente traslazionale allo studio delle patologie cardiovascolari.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 29: (1999) 1181-1189
- [2] Nicholson JK, Lindon JCSystems biology: Metabonomics. *Nature* 455: (2008) 1054-1056
- [3] Oliver SGFunctional genomics: lessons from yeast. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357: (2002) 17-23
- [4] Coen M, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JKNMR-based metabolic profiling and metabonomic approaches to problems in molecular toxicology. *Chem Res Toxicol* 21: (2008) 9-27
- [5] Dunn WB, Broadhurst DI, Atherton HJ, Goodacre R, Griffin JLSystems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Soc Rev* 40: (2011) 387-426
- [6] Ellis DI, Dunn WB, Griffin JL, Allwood JW, Goodacre RMetabolic fingerprinting as a diagnostic tool. *Pharmacogenomics* 8: (2007) 1243-1266
- [7] Kristal BS, Shurubor YI, Kaddurah-Daouk R, Matson WRHigh-performance liquid chromatography separations coupled with coulometric electrode array detectors: a unique approach to metabolomics. *Methods Mol Biol* 358: (2007) 159-174
- [8] Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, et al.Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 119: (2009) e21
- [9] Dayer M, Cowie MRHeart failure: diagnosis and healthcare burden. *Clin Med* 4: (2004) 13-18
- [10] McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, et al.ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis

and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. Eur Heart J 33: (2012) 1787-1847

[11] Roger LEpidemiology of Heart Failure. Circulation Research 113: (2013) 646-659

[12] Stewart S, Jenkins A, Buchan S, McGuire A, Capewell S, et al.The current cost of heart failure to the National Health Service in the UK. Eur J Heart Fail 4: (2002) 361-371

[13] Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). The CONSENSUS Trial Study Group. N Engl J Med 316: (1987) 1429-1435

[14] Pfeffer MA, Braunwald E, Moyé LA, Basta L, Brown EJ, et al.Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. N Engl J Med 327: (1992) 669-677

[15] Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, et al.The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. N Engl J Med 341: (1999) 709-717

[16] A randomized trial of beta-blockade in heart failure. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study (CIBIS). CIBIS Investigators and Committees. Circulation 90: (1994) 1765-1773

[17] Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, et al.The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. N Engl J Med 334: (1996) 1349-1355

[18] Bristow MR, Saxon LA, Boehmer J, Krueger S, Kass DA, et al.Cardiac-resynchronization therapy with or without an implantable defibrillator in advanced chronic heart failure. N Engl J Med 350: (2004) 2140-2150

- [19] Cleland JG, Daubert JC, Erdmann E, Freemantle N, Gras D, et al. The effect of cardiac resynchronization on morbidity and mortality in heart failure. *N Engl J Med* 352: (2005) 1539-1549
- [20] Neubauer S The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med* 356: (2007) 1140-1151
- [21] HERRMANN G, DECHERD GM THE CHEMICAL NATURE OF HEART FAILURE*. *Annals of Internal Medicine* 12: (1939) 1233
- [22] OLSON RE, SCHWARTZ WB Myocardial metabolism in congestive heart failure. *Medicine (Baltimore)* 30: (1951) 21-41
- [23] OLSON RE Myocardial metabolism in congestive heart failure. *J Chronic Dis* 9: (1959) 442-464
- [24] Wollenberger A On the energy-rich phosphate supply of the failing heart. *American Journal of Physiology--Legacy Content* 150: (1947) 733
- [25] Essop MF, Opie LH Metabolic therapy for heart failure. *Eur Heart J* 25: (2004) 1765-1768
- [26] Ingwall JS, Weiss RG Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. *Circ Res* 95: (2004) 135-145
- [27] Ingwall JS Energetics of the failing heart: new insights using genetic modification in the mouse. *Arch Mal Coeur Vaiss* 99: (2006) 839-847
- [28] Ingwall JS Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovasc Res* 81: (2009) 412-419
- [29] Ingwall JS On the control of metabolic remodeling in mitochondria of the failing heart. *Circ Heart Fail* 2: (2009) 275-277
- [30] Lopaschuk GD, Rebeyka IM, Allard MF Metabolic modulation: a means to mend a broken heart. *Circulation* 105: (2002) 140-142
- [31] Morrow DA, Givertz MM Modulation of myocardial energetics: emerging evidence for a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circulation* 112: (2005) 3218-3221

- [32] Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GDMyocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 85: (2005) 1093-1129
- [33] Taegtmeyer HMetabolism--the lost child of cardiology. *J Am Coll Cardiol* 36: (2000) 1386-1388
- [34] Taegtmeyer HCardiac metabolism as a target for the treatment of heart failure. *Circulation* 110: (2004) 894-896
- [35] van Bilsen M, Smeets PJ, Gilde AJ, van der Vusse GJMetabolic remodelling of the failing heart: the cardiac burn-out syndrome?*Cardiovasc Res* 61: (2004) 218-226
- [36] Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler VEnergy metabolism in heart failure. *J Physiol* 555: (2004) 1-13
- [37] Bessman SP, Geiger PJTransport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. *Science* 211: (1981) 448-452
- [38] Ingwall JS ATP and the HeartKluwer Academic Publishers, 2002
- [39] Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HMIntracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 281 (Pt 1): (1992) 21-40
- [40] Guimbal C, Kilimann MWA Na(+)-dependent creatine transporter in rabbit brain, muscle, heart, and kidney. cDNA cloning and functional expression. *J Biol Chem* 268: (1993) 8418-8421
- [41] Wyss M, Wallimann TCreatine metabolism and the consequences of creatine depletion in muscle. *Mol Cell Biochem* 133-134: (1994) 51-66
- [42] Bottomley PAMR spectroscopy of the human heart: the status and the challenges. *Radiology* 191: (1994) 593-612

- [43] Garlick PB, Radda GK, Seeley PJ Phosphorus NMR studies on perfused heart. *Biochem Biophys Res Commun* 74: (1977) 1256-1262
- [44] Ingwall JS Phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy of cardiac and skeletal muscles. *Am J Physiol* 242: (1982) H729-H744
- [45] Neubauer S Cardiac magnetic resonance spectroscopy. *Current Cardiology Reports* 5: (2003) 75-82
- [46] Dávila-Román VG, Vedala G, Herrero P, de las Fuentes L, Rogers JG, et al. Altered myocardial fatty acid and glucose metabolism in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 40: (2002) 271-277
- [47] Lewandowski ED Cardiac carbon 13 magnetic resonance spectroscopy: on the horizon or over the rainbow? *J Nucl Cardiol* 9: (2002) 419-428
- [48] Vitale GD, deKemp RA, Ruddy TD, Williams K, Beanlands RS Myocardial glucose utilization and optimization of (18)F-FDG PET imaging in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus, coronary artery disease, and left ventricular dysfunction. *J Nucl Med* 42: (2001) 1730-1736
- [49] Wallhaus TR, Taylor M, DeGrado TR, Russell DC, Stanko P, et al. Myocardial free fatty acid and glucose use after carvedilol treatment in patients with congestive heart failure. *Circulation* 103: (2001) 2441-2446
- [50] Ning XH, Zhang J, Liu J, Ye Y, Chen SH, et al. Signaling and expression for mitochondrial membrane proteins during left ventricular remodeling and contractile failure after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 36: (2000) 282-287
- [51] Chandler MP, Kerner J, Huang H, Vazquez E, Reszko A, et al. Moderate severity heart failure does not involve a downregulation of myocardial fatty acid oxidation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: (2004) H1538-H1543

- [52] Osorio JC, Stanley WC, Linke A, Castellari M, Diep QN, et al. Impaired myocardial fatty acid oxidation and reduced protein expression of retinoid X receptor- α in pacing-induced heart failure. *Circulation* 106: (2002) 606-612
- [53] Marín-García J, Goldenthal MJ, Moe GW Abnormal cardiac and skeletal muscle mitochondrial function in pacing-induced cardiac failure. *Cardiovasc Res* 52: (2001) 103-110
- [54] Quigley AF, Kapsa RM, Esmore D, Hale G, Byrne E Mitochondrial respiratory chain activity in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Card Fail* 6: (2000) 47-55
- [55] Murray AJ, Anderson RE, Watson GC, Radda GK, Clarke K Uncoupling proteins in human heart. *Lancet* 364: (2004) 1786-1788
- [56] Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr* 28: (2015) 1-39.e14
- [57] Marwick TH Should we be evaluating the ventricle or the myocardium? Advances in tissue characterization. *J Am Soc Echocardiogr* 17: (2004) 168-172
- [58] Eriksson L, Umetrics U Multi- and megavariable data analysis Umetrics AB; Umeå, Sweden 2006
- [59] Griffin JL, Atherton H, Shockcor J, Atzori L Metabolomics as a tool for cardiac research. *Nat Rev Cardiol* 8: (2011) 630-643
- [60] Mercuro G, Bassareo PP, Deidda M, Cadeddu C, Barberini L, et al. Metabolomics: a new era in cardiology? *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 12: (2011) 800-805
- [61] Sabatine MS, Liu E, Morrow DA, Heller E, McCarroll R, et al. Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia. *Circulation* 112: (2005) 3868-3875

- [62] Shah AM, Mann DL In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure: recent advances in basic science. *Lancet* 378: (2011) 704-712
- [63] Tenori L, Hu X, Pantaleo P, Alterini B, Castelli G, et al. Metabolomic fingerprint of heart failure in humans: a nuclear magnetic resonance spectroscopy analysis. *Int J Cardiol* 168: (2013) e113-e115
- [64] Du Z, Shen A, Huang Y, Su L, Lai W, et al. ¹H-NMR-Based Metabolic Analysis of Human Serum Reveals Novel Markers of Myocardial Energy Expenditure in Heart Failure Patients. *PLoS One* 9: (2014) e88102
- [65] Hung CL, Verma A, Uno H, Shin SH, Bourgoun M, et al. Longitudinal and circumferential strain rate, left ventricular remodeling, and prognosis after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 56: (2010) 1812-1822
- [66] Beer M, Seyfarth T, Sandstede J, Landschütz W, Lipke C, et al. Absolute concentrations of high-energy phosphate metabolites in normal, hypertrophied, and failing human myocardium measured noninvasively with (31)P-SLOOP magnetic resonance spectroscopy. *J Am Coll Cardiol* 40: (2002) 1267-1274
- [67] Hardy CJ, Weiss RG, Bottomley PA, Gerstenblith G Altered myocardial high-energy phosphate metabolites in patients with dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 122: (1991) 795-801
- [68] Nascimben L, Ingwall JS, Pauletto P, Friedrich J, Gwathmey JK, et al. Creatine kinase system in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation* 94: (1996) 1894-1901
- [69] Neubauer S, Krahe T, Schindler R, Horn M, Hillenbrand H, et al. ³¹P magnetic resonance spectroscopy in dilated cardiomyopathy and coronary artery disease. Altered cardiac high-energy phosphate metabolism in heart failure. *Circulation* 86: (1992) 1810-1818
- [70] Starling RC, Hammer DF, Altschuld RA Human myocardial ATP content and in vivo contractile function. *Mol Cell Biochem* 180: (1998) 171-177

- [71] Razeghi P, Young ME, Alcorn JL, Moravec CS, Frazier OH, et al. Metabolic gene expression in fetal and failing human heart. *Circulation* 104: (2001) 2923-2931
- [72] Razeghi P, Taegtmeyer H Cardiac remodeling: UPS lost in transit. *Circ Res* 97: (2005) 964-966
- [73] Scognamiglio R, Negut C, Palisi M, Dioguardi FS, Coccato M, et al. Effects of Oral Amino Acid Supplements on Cardiac Function and Remodeling in Patients with Type 2 Diabetes with Mild-to-Moderate Left Ventricular Dysfunction. *The American Journal of Cardiology* 101: (2008) S111 - S115
- [74] Depre C, Shipley GL, Chen W, Han Q, Doenst T, et al. Unloaded heart in vivo replicates fetal gene expression of cardiac hypertrophy. *Nat Med* 4: (1998) 1269-1275
- [75] Rajabi M, Kassiotis C, Razeghi P, Taegtmeyer H Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis. *Heart Fail Rev* 12: (2007) 331-343
- [76] Lamb HJ, Beyerbach HP, van der Laarse A, Stoel BC, Doornbos J, et al. Diastolic dysfunction in hypertensive heart disease is associated with altered myocardial metabolism. *Circulation* 99: (1999) 2261-2267
- [77] Shen W, Asai K, Uechi M, Mathier MA, Shannon RP, et al. Progressive loss of myocardial ATP due to a loss of total purines during the development of heart failure in dogs: a compensatory role for the parallel loss of creatine. *Circulation* 100: (1999) 2113-2118
- [78] Sykut-Cegielska J, Gradowska W, Mercimek-Mahmutoglu S, Stöckler-Ipsiroglu S Biochemical and clinical characteristics of creatine deficiency syndromes. *Acta Biochim Pol* 51: (2004) 875-882
- [79] Ruiz-Meana M, Pina P, Garcia-Dorado D, Rodríguez-Sinovas A, Barba I, et al. Glycine protects cardiomyocytes against lethal reoxygenation injury by inhibiting mitochondrial permeability transition. *J Physiol* 558: (2004) 873-882

- [80] di Salvo ML, Contestabile R, Paiardini A, Maras B Glycine consumption and mitochondrial serine hydroxymethyltransferase in cancer cells: The heme connection. *Medical Hypotheses* 80: (2013) 633-636
- [81] Ost M, Keipert S, van Schothorst EM, Donner V, van der Stelt I, et al. Muscle mitohormesis promotes cellular survival via serine/glycine pathway flux. *FASEB J* (2014)
- [82] Cullen ME, Yuen AH, Felkin LE, Smolenski RT, Hall JL, et al. Myocardial expression of the arginine:glycine amidinotransferase gene is elevated in heart failure and normalized after recovery: potential implications for local creatine synthesis. *Circulation* 114: (2006) I16-I20
- [83] Holub BJ Metabolism and function of myo-inositol and inositol phospholipids. *Annual review of nutrition* 6: (1986) 563-597
- [84] Kohl C, Schmitz W, Scholz H, Scholz J Evidence for the existence of inositol tetrakisphosphate in mammalian heart. Effect of alpha 1-adrenoceptor stimulation. *Circulation Research* 66: (1990) 580-583
- [85] Kawaguchi H, Sano H, Iizuka K, Okada H, Kudo T, et al. Phosphatidylinositol metabolism in hypertrophic rat heart. *Circulation Research* 72: (1993) 966-972
- [86] Kawaguchi H, Shoki M, Sano H, Kudo T, Sawa H, et al. Phospholipid metabolism in cardiomyopathic hamster heart cells. *Circulation research* 69: (1991) 1015-1021
- [87] Alexander D, Lombardi R, Rodriguez G, Mitchell MM, Marian AJ Metabolomic distinction and insights into the pathogenesis of human primary dilated cardiomyopathy. *Eur J Clin Invest* 41: (2011) 527-538
- [88] Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, et al. The human serum metabolome. *PloS one* 6: (2011) e16957

- [89] Kang SM, Park JC, Shin MJ, Lee H, Oh J, et al.¹H nuclear magnetic resonance based metabolic urinary profiling of patients with ischemic heart failure. *Clin Biochem* 44: (2011) 293-299
- [90] Chung JH, Kim JS, Kim OY, Kang SM, Hwang GS, et al. Urinary ketone is associated with the heart failure severity. *Clin Biochem* 45: (2012) 1697-1699
- [91] Russell RR, Taegtmeyer H Pyruvate carboxylation prevents the decline in contractile function of rat hearts oxidizing acetoacetate. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 261: (1991) H1756-H1762
- [92] Russell RR, Taegtmeyer H Changes in citric acid cycle flux and anaplerosis antedate the functional decline in isolated rat hearts utilizing acetoacetate. *J Clin Invest* 87: (1991) 384-390
- [93] Hernandez AM, Huber JS, Murphy ST, Janabi M, Zeng GL, et al. Longitudinal evaluation of left ventricular substrate metabolism, perfusion, and dysfunction in the spontaneously hypertensive rat model of hypertrophy using small-animal PET/CT imaging. *J Nucl Med* 54: (2013) 1938-1945
- [94] Spindler M, Engelhardt S, Niebler R, Wagner H, Hein L, et al. Alterations in the myocardial creatine kinase system precede the development of contractile dysfunction in beta(1)-adrenergic receptor transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 35: (2003) 389-397
- [95] Murray CJ, Lopez AD Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349: (1997) 1498-1504
- [96] Bonow RO, Smaha LA, Smith SC, Mensah GA, Lenfant C World Heart Day 2002 the international burden of cardiovascular disease: responding to the emerging global epidemic. *Circulation* 106: (2002) 1602-1605
- [97] Davies MJ The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart* 83: (2000) 361-366
- [98] Libby P Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 104: (2001) 365-372

- [99] Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 121: (2010) 948-954
- [100] Detry JM. The pathophysiology of myocardial ischaemia. *European heart journal* 17: (1996) 48-52
- [101] Gould KL, Lipscomb K. Effects of coronary stenoses on coronary flow reserve and resistance. *Am J Cardiol* 34: (1974) 48-55
- [102] Gould KL. *Coronary artery stenosis and reversing atherosclerosis*. A Hodder Arnold Publication, 1999
- [103] Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med* 247: (2000) 349-358
- [104] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: (1999) 115-126
- [105] Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420: (2002) 868-874
- [106] Rivard A, Andrés V. Vascular smooth muscle cell proliferation in the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular diseases. *Histol Histopathol* 15: (2000) 557-571
- [107] Raines EW. The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: relationships to vascular disease. *Int J Exp Pathol* 81: (2000) 173-182
- [108] Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 90: (2002) 251-262
- [109] Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation* 94: (1996) 2013-2020
- [110] Kinlay S, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease and implications for therapy. *Am J Cardiol* 80: (1997) 11I-16I
- [111] Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: (1993) 2002-2012

- [112] Rees DD, Palmer RM, Moncada S Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: (1989) 3375-3378
- [113] Luft FC Proinflammatory effects of angiotensin II and endothelin: targets for progression of cardiovascular and renal diseases. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11: (2002) 59-66
- [114] Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, Selwyn AP, Ganz P, et al. Flow-induced vasodilation of the human brachial artery is impaired in patients <40 years of age with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 78: (1996) 1210-1214
- [115] Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 315: (1986) 1046-1051
- [116] Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 88: (1993) 2149-2155
- [117] Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, Gallagher SJ, Coleman SM, et al. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 86: (1990) 228-234
- [118] Loscalzo J Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res* 88: (2001) 756-762
- [119] Hawiger J Innate immunity and inflammation: a transcriptional paradigm. *Immunol Res* 23: (2001) 99-109
- [120] Rosenfeld ME Cellular mechanisms in the development of atherosclerosis. *Diabetes Res Clin Pract* 30 Suppl: (1996) 1-11

- [121] De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 96: (1995) 60-68
- [122] Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: (1996) 9114-9119
- [123] Vallance P, Chan N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart* 85: (2001) 342-350
- [124] Diodati JG, Dakak N, Gilligan DM, Quyyumi AA. Effect of atherosclerosis on endothelium-dependent inhibition of platelet activation in humans. *Circulation* 98: (1998) 17-24
- [125] Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 148: (1987) 1482-1489
- [126] Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, Pandian NG, Rand WM, et al. Peripheral vascular endothelial function testing as a noninvasive indicator of coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 38: (2001) 1843-1849
- [127] Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 104: (2001) 2673-2678
- [128] Camici PG, Crea F. Coronary microvascular dysfunction. *N Engl J Med* 356: (2007) 830-840
- [129] Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87: (2000) 840-844
- [130] Maytin M, Leopold J, Loscalzo J. Oxidant stress in the vasculature. *Curr Atheroscler Rep* 1: (1999) 156-164

- [131] Zalba G, Beaumont J, San José G, Fortuño A, Fortuño MA, et al. Vascular oxidant stress: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol Biochem* 56: (2000) 57-64
- [132] Griending KK, Harrison DG. Out, damned, dot: studies of the NADPH oxidase in atherosclerosis. *J Clin Invest* 108: (2001) 1423-1424
- [133] Tomasian D, Keaney JF, Vita JA. Antioxidants and the bioactivity of endothelium-derived nitric oxide. *Cardiovasc Res* 47: (2000) 426-435
- [134] Yura T, Fukunaga M, Khan R, Nassar GN, Badr KF, et al. Free-radical-generated F₂-isoprostane stimulates cell proliferation and endothelin-1 expression on endothelial cells. *Kidney Int* 56: (1999) 471-478
- [135] Ashfaq S, Abramson JL, Jones DP, Rhodes SD, Weintraub WS, et al. The relationship between plasma levels of oxidized and reduced thiols and early atherosclerosis in healthy adults. *J Am Coll Cardiol* 47: (2006) 1005-1011
- [136] Ashfaq S, Abramson JL, Jones DP, Rhodes SD, Weintraub WS, et al. Endothelial function and aminothiol biomarkers of oxidative stress in healthy adults. *Hypertension* 52: (2008) 80-85
- [137] Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 8: (2006) 1865-1879
- [138] Dhawan SS, Eshtehardi P, McDaniel MC, Fike LV, Jones DP, et al. The role of plasma aminothiols in the prediction of coronary microvascular dysfunction and plaque vulnerability. *Atherosclerosis* 219: (2011) 266-272
- [139] Gokce N, Keaney JF, Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, et al. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation* 105: (2002) 1567-1572
- [140] Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, et al. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 101: (2000) 948-954

- [141] Gimbrone MA, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 902: (2000) 230-9; discussion 239-40
- [142] Vogel RA, Corretti MC Estrogens, progestins, and heart disease: can endothelial function divine the benefit? *Circulation* 97: (1998) 1223-1226
- [143] Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, Gilligan DM, Panza JA, et al. Contribution of nitric oxide to metabolic coronary vasodilation in the human heart. *Circulation* 92: (1995) 320-326
- [144] Zeiher AM, Drexler H, Wollschläger H, Just H Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation* 83: (1991) 391-401
- [145] Brindle JT, Antti H, Holmes E, Tranter G, Nicholson JK, et al. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H-NMR-based metabonomics. *Nat Med* 8: (2002) 1439-1444
- [146] Kirschenlohr HL, Griffin JL, Clarke SC, Rhydwen R, Grace AA, et al. Proton NMR analysis of plasma is a weak predictor of coronary artery disease. *Nat Med* 12: (2006) 705-710
- [147] Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: (2003) 168-175
- [148] Craig SA Betaine in human nutrition. *Am J Clin Nutr* 80: (2004) 539-549
- [149] GRAYBIEL A, PATTERSON CA Use of betaine and glycocyamine in the treatment of patients with heart disease: preliminary report. *Ann West Med Surg* 5: (1951) 863-875
- [150] MORRISON LM Results of betaine treatment of atherosclerosis. *Am J Dig Dis* 19: (1952) 381-384

- [151] Bidulescu A, Chambless LE, Siega-Riz AM, Zeisel SH, Heiss G Usual choline and betaine dietary intake and incident coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *BMC Cardiovasc Disord* 7: (2007) 20
- [152] Olthof MR, Bots ML, Katan MB, Verhoef P Effect of folic acid and betaine supplementation on flow-mediated dilation: a randomized, controlled study in healthy volunteers. *PLoS Clin Trials* 1: (2006) e10
- [153] Wierzbicki AS Homocysteine and cardiovascular disease: a review of the evidence. *Diab Vasc Dis Res* 4: (2007) 143-150
- [154] Bloomer RJ, Farney TM, Trepanowski JF, McCarthy CG, Canale RE Effect of betaine supplementation on plasma nitrate/nitrite in exercise-trained men. *J Int Soc Sports Nutr* 8: (2011) 5
- [155] Ganesan B, Buddhan S, Jeyakumar R, Anandan R Protective effect of betaine on changes in the levels of membrane-bound ATPase activity and mineral status in experimentally induced myocardial infarction in Wistar rats. *Biol Trace Elem Res* 131: (2009) 278-290
- [156] Lever M, George PM, Atkinson W, Molyneux SL, Elmslie JL, et al. Plasma lipids and betaine are related in an acute coronary syndrome cohort. *PLoS One* 6: (2011) e21666
- [157] Fan RX, Lü SW, DU YP, Hou MJ, Zhu HL [Anti-atherosclerotic effect of betaine in apolipoprotein E-deficient mice]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 42: (2008) 742-747
- [158] Barnes J, Mayes MD Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. *Curr Opin Rheumatol* 24: (2012) 165-170
- [159] LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 15: (1988) 202-205
- [160] Wollheim FA Classification of systemic sclerosis. Visions and reality. *Rheumatology (Oxford)* 44: (2005) 1212-1216

- [161] Maddison PJ Mixed connective tissue disease: overlap syndromes. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol* 14: (2000) 111-124
- [162] Dimitroulas T, Giannakoulas G, Karvounis H, Settas L, Kitas GD Systemic sclerosis-related pulmonary hypertension: unique characteristics and future treatment targets. *Curr Pharm Des* 18: (2012) 1457-1464
- [163] Johnson SR, Granton JT Pulmonary hypertension in systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Eur Respir Rev* 20: (2011) 277-286
- [164] Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS Harrison--Principi di Medicina Interna--Il manuale. 16a Edizione New York, NY: McGraw-Hill, 2007
- [165] Strollo D, Goldin J Imaging lung disease in systemic sclerosis. *Curr Rheumatol Rep* 12: (2010) 156-161
- [166] Desai CS, Lee DC, Shah SJ Systemic sclerosis and the heart: current diagnosis and management. *Curr Opin Rheumatol* 23: (2011) 545-554
- [167] Fernandes F, Ramires FJ, Arteaga E, Ianni BM, Bonfá ES, et al. Cardiac remodeling in patients with systemic sclerosis with no signs or symptoms of heart failure: an endomyocardial biopsy study. *J Card Fail* 9: (2003) 311-317
- [168] D'Angelo WA, Fries JF, Masi AT, Shulman LE Pathologic observations in systemic sclerosis (scleroderma). A study of fifty-eight autopsy cases and fifty-eight matched controls. *Am J Med* 46: (1969) 428-440
- [169] Steen V The heart in systemic sclerosis. *Curr Rheumatol Rep* 6: (2004) 137-140
- [170] Bulkley BH, Ridolfi RL, Salyer WR, Hutchins GM Myocardial lesions of progressive systemic sclerosis. A cause of cardiac dysfunction. *Circulation* 53: (1976) 483-490

- [171] Mukerjee D, St George D, Coleiro B, Knight C, Denton CP, et al. Prevalence and outcome in systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension: application of a registry approach. *Ann Rheum Dis* 62: (2003) 1088-1093
- [172] Koh ET, Lee P, Gladman DD, Abu-Shakra M. Pulmonary hypertension in systemic sclerosis: an analysis of 17 patients. *Br J Rheumatol* 35: (1996) 989-993
- [173] Kawut SM, Taichman DB, Archer-Chicko CL, Palevsky HI, Kimmel SE. Hemodynamics and survival in patients with pulmonary arterial hypertension related to systemic sclerosis. *Chest* 123: (2003) 344-350
- [174] Williams MH, Das C, Handler CE, Akram MR, Davar J, et al. Systemic sclerosis associated pulmonary hypertension: improved survival in the current era. *Heart* 92: (2006) 926-932
- [175] Trad S, Amoura Z, Beigelman C, Haroche J, Costedoat N, et al. Pulmonary arterial hypertension is a major mortality factor in diffuse systemic sclerosis, independent of interstitial lung disease. *Arthritis Rheum* 54: (2006) 184-191
- [176] Pietra GG, Capron F, Stewart S, Leone O, Humbert M, et al. Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43: (2004) 25S-32S
- [177] Proudman SM, Stevens WM, Sahhar J, Celermajer DP. Pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: the need for early detection and treatment. *Intern Med J* 37: (2007) 485-494
- [178] Hachulla E, Coghlan JGA. A new era in the management of pulmonary arterial hypertension related to scleroderma: endothelin receptor antagonism. *Ann Rheum Dis* 63: (2004) 1009-1014
- [179] Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Libby P. *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*, 2-Volume Set. Saunders, 2011
- [180] Galiè N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, et al. Linee guida per la diagnosi e il trattamento dell'ipertensione polmonare. *Eur Heart J* 30: (2009) 2493-2537

- [181] Luo Y, Zhu J, Gao Y Metabolomic analysis of the plasma of patients with high-altitude pulmonary edema (HAPE) using ¹H NMR. *Mol Biosyst* 8: (2012) 1783-1788
- [182] Lever M, George PM, Elmslie JL, Atkinson W, Slow S, et al. Betaine and secondary events in an acute coronary syndrome cohort. *PLoS One* 7: (2012) e37883
- [183] Lv S, Fan R, Du Y, Hou M, Tang Z, et al. Betaine supplementation attenuates atherosclerotic lesion in apolipoprotein E-deficient mice. *Eur J Nutr* 48: (2009) 205-212
- [184] Ueland P Choline and betaine in health and disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 34: (2011) 3-15
- [185] Detopoulou P, Panagiotakos DB, Antonopoulou S, Pitsavos C, Stefanadis C Dietary choline and betaine intakes in relation to concentrations of inflammatory markers in healthy adults: the ATTICA study. *Am J Clin Nutr* 87: (2008) 424-430
- [186] Olthof MR, Verhoef P Effects of betaine intake on plasma homocysteine concentrations and consequences for health. *Curr Drug Metab* 6: (2005) 15-22
- [187] Durand P, Lussier-Cacan S, Blache D Acute methionine load-induced hyperhomocysteinemia enhances platelet aggregation, thromboxane biosynthesis, and macrophage-derived tissue factor activity in rats. *FASEB J* 11: (1997) 1157-1168
- [188] Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, Fitzgerald LA, Rodgers GM Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 13: (1993) 1327-1333
- [189] Lentz SR, Sadler J E Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest* 88: (1991) 1906-1914
- [190] Ganesan B, Buddhhan S, Anandan R, Sivakumar R, Anbin Ezhilan R Antioxidant defense of betaine against isoprenaline-induced myocardial infarction in rats. *Molecular Biology Reports* 37: (2010) 1319-1327

- [191] Cheng KK, Benson GM, Grimsditch DC, Reid DG, Connor SC, et al. A metabolomic study of the LDL receptor null mouse fed a high-fat diet reveals profound perturbations in choline metabolism that are shared with ApoE null mice. *Physiol Genomics* (2010)
- [192] Nomura A, Zhang M, Sakamoto T, Ishii Y, Morishima Y, et al. Anti-inflammatory activity of creatine supplementation in endothelial cells in vitro. *Br J Pharmacol* 139: (2003) 715-720
- [193] Sestili P, Martinelli C, Bravi G, Piccoli G, Curci R, et al. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 40: (2006) 837-849
- [194] Watts JA, Gellar MA, Fulkerson MB, Das SK, Kline JA Arginase depletes plasma l-arginine and decreases pulmonary vascular reserve during experimental pulmonary embolism. *Pulm Pharmacol Ther* 25: (2012) 48-54
- [195] Luiking YC, Ten Have GA, Wolfe RR, Deutz NE Arginine de novo and Nitric oxide production in disease states. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2012)
- [196] Hasegawa S, Ichiyama T, Sonaka I, Ohsaki A, Okada S, et al. Cysteine, histidine and glycine exhibit anti-inflammatory effects in human coronary arterial endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 167: (2012) 269-274
- [197] McCarty MF, Barroso-Aranda J, Contreras F The hyperpolarizing impact of glycine on endothelial cells may be anti-atherogenic. *Med Hypotheses* 73: (2009) 263-264
- [198] Fallahzadeh MK, Namazi MR, Gupta RC Taurine: a potential novel addition to the anti-systemic sclerosis weaponry. *Arch Med Res* 41: (2010) 59-61
- [199] Wang JH, Redmond HP, Watson RW, Condon C, Bouchier-Hayes D The beneficial effect of taurine on the prevention of human endothelial cell death. *Shock* 6: (1996) 331-338

- [200] Tan B, Jiang DJ, Huang H, Jia SJ, Jiang JL, et al. Taurine protects against low-density lipoprotein-induced endothelial dysfunction by the DDAH/ADMA pathway. *Vascul Pharmacol* 46: (2007) 338-345
- [201] Konstantinova SV, Tell GS, Vollset SE, Nygård O, Bleie Ø, et al. Divergent associations of plasma choline and betaine with components of metabolic syndrome in middle age and elderly men and women. *J Nutr* 138: (2008) 914-920
- [202] Vance DE. Role of phosphatidylcholine biosynthesis in the regulation of lipoprotein homeostasis. *Curr Opin Lipidol* 19: (2008) 229-234
- [203] Isales CM, Min L, Hoffman WH. Acetoacetate and β -Hydroxybutyrate Differentially Regulate Endothelin-1 and Vascular Endothelial Growth Factor in Mouse Brain Microvascular Endothelial Cells. *Journal of Diabetes and its Complications* 13: (1999) 91 - 97
- [204] de Lima Pelaez P, Funchal C, Loureiro SO, Heimfarth L, Zamoner A, et al. Branched-chain amino acids accumulating in maple syrup urine disease induce morphological alterations in C6 glioma cells probably through reactive species. *Int J Dev Neurosci* 25: (2007) 181-189
- [205] Piscopo P, Crestini A, Adduci A, Ferrante A, Massari M, et al. Altered oxidative stress profile in the cortex of mice fed an enriched branched-chain amino acids diet: possible link with amyotrophic lateral sclerosis? *J Neurosci Res* 89: (2011) 1276-1283